

PCT/JP03/14389

12.11.03

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日      2003年 9月22日  
Date of Application:

RECEIVED
09 JAN 2004
WIPO      PCT

出願番号      特願2003-330775  
Application Number:  
[ST. 10/C]:      [JP 2003-330775]

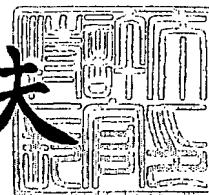
出願人      持田製薬株式会社  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年12月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3106050

【書類名】 特許願  
【整理番号】 MD0677  
【提出日】 平成15年 9月22日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K 39/00  
G01N 33/53  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都新宿区四谷一丁目 7番地 持田製薬株式会社内  
【氏名】 古迫 正司  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都新宿区四谷一丁目 7番地 持田製薬株式会社内  
【氏名】 白川 嘉門  
【特許出願人】  
【識別番号】 000181147  
【氏名又は名称】 持田製薬株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100080159  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 渡辺 望稔  
【電話番号】 3864-4498  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100090217  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 三和 晴子  
【電話番号】 3864-4498  
【先の出願に基づく優先権主張】  
【出願番号】 特願2002-328866  
【出願日】 平成14年11月12日  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 006910  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 9715033

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

配列番号 1 に記載の 16 アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体。

【請求項 2】

サンドイッヂ免疫測定法により測定することを特徴とする、配列番号 1 に記載の 16 アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体または該抗体の断片を含む、ヒト低分子量 CD 14 測定キット。

【請求項 3】

該配列番号 1 に記載の 16 アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体または該抗体の断片を不溶性担体に結合した抗体または該抗体の断片として含み、さらに標識したヒト低分子量 CD 14 に結合する物質を第二の結合物質として含む請求項 2 に記載のキット。

【請求項 4】

該配列番号 1 に記載の 16 アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体または該抗体の断片が標識されていることを特徴とし、さらにヒト低分子量 CD 14 に結合する物質を第二の結合物質として不溶性担体に結合して含む請求項 2 に記載のキット。

【請求項 5】

該ヒト低分子量 CD 14 に結合する物質が、ヒト低分子量 CD 14 に結合する抗体である請求項 3 若しくは請求項 4 に記載のキット。

【請求項 6】

該ヒト低分子量 CD 14 に結合する抗体が、モノクローナル抗体である請求項 5 に記載のキット。

【請求項 7】

該ヒト低分子量 CD 14 に結合する物質が、ヒト低分子量 CD 14 に結合する抗体の断片である請求項 3 若しくは請求項 4 に記載のキット。

【請求項 8】

競合法によるサンドイッヂ免疫測定法により測定することを特徴とする、標識したヒト低分子量 CD 14 若しくは標識したヒト低分子量 CD 14 類似物質を含む請求項 2 に記載のキット。

【請求項 9】

標識が、酵素、色素、金コロイド、着色ラテックス、化学発光物質、蛍光物質またはアイソトープの少なくとも一つであることを特徴とする請求項 3 ~ 8 のいずれかに記載のキット。

【請求項 10】

該サンドイッヂ免疫測定法がイムノクロマト法を利用した測定法であることを特徴とする請求項 2 ~ 7 のいずれかに記載のキット。

【請求項 11】

該サンドイッヂ免疫測定法がフロースルー法を利用した測定法であることを特徴とする請求項 2 ~ 7 のいずれかに記載のキット。

【書類名】明細書

【発明の名称】ヒト低分子量CD14測定キット

【技術分野】

【0001】

本発明は配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体に関する。また、サンドイッチ免疫測定法により測定することを特徴とするヒト低分子量CD14測定キット及びその測定方法に関する。さらに該キットを用いた敗血症の新規な診断方法に関する。

【背景技術】

【0002】

CD14分子は単核球細胞の膜表面上に発現している糖蛋白質を認識する一群の抗体により同定される蛋白質として1986年に第3回Leukocyte Typing Conferenceにて、命名された。1990年、WrightらはこのCD14分子が、エンドトキシンであるLPSのレセプターであることを明らかにした（非特許文献1参照）。このCD14分子は分子量53～55kDaの糖蛋白質で、mRNAは約1.4kbのサイズで356個のアミノ酸からなることがcDNAの解析から明らかにされた（非特許文献2参照）。

【0003】

ヒトCD14分子には、膜結合型CD14のほかに可溶型CD14があり、血中には分子量の異なる複数の可溶型CD14が存在することが報告された（非特許文献3参照）。また、Landmannらは、敗血症患者血清の可溶型CD14のウエスタンプロット分析を行い、約55kDaの可溶型CD14が敗血症死亡例や発作性夜行性ヘモグロビン尿症（PNH）患者で高値であり、正常人血清中にはこの分子が認められず、正常人には分子量の少し小さい49kDaの可溶型CD14が検出されたことを報告した（非特許文献4参照）。この分子量の異なるサブタイプについては、糖鎖の違いが関与していること、またNおよびO結合型糖鎖を除去してもなお2種の異なる分子量の可溶型CD14が血中に存在することをSteletterらが報告している（非特許文献5参照）。また、Bufflerらは可溶型CD14のC末端分析を行い可溶型CD14の327番のセリン残基にGPI基が結合すること、約56kDaの分子量を持つ可溶型CD14はGPIアンカリングされない分子種であることを報告した（非特許文献6参照）。

【0004】

CD14分子に対する抗体はBazillらの作製したMEM-18（非特許文献7参照）、Shuttらの作製したRoMo-1（非特許文献8参照）、Steinmannらの作製した3C10（非特許文献9参照）をはじめ、多くの抗CD14抗体が作製され、CD14蛋白質の同定に使用されている。また、これら抗体を用いた可溶型CD14の測定系がShuttら（特許文献1参照）、Bazillら（非特許文献10参照）、Grunwaldら（非特許文献11参照）により報告され、ヒト体液中の可溶型CD14が測定されるようになった。さらに、可溶型CD14-ELISAキットがIBL-Hamburg、Medgenix、R&D Systemsより発売され、敗血症をはじめとして多くの疾患で可溶型CD14の測定が行われている（非特許文献12、13参照）。しかし敗血症以外の疾患でも疾患の進行度に伴って前述の約55kDa、49kDaを含む可溶型CD14（報告により、その分子量は異なるため、約55kDa、49kDaに限定されるわけではない、以下同）濃度が上昇し、可溶型CD14は敗血症特異的なマーカーではないことが明らかになった（非特許文献14～16参照）。また、可溶型CD14は敗血症の重症化のマーカーとして期待されていたが、敗血症性ショックとの相関が見られないこと（非特許文献17参照）、全身性炎症反応症候群（SIRS）との相関が認められないことから（非特許文献18参照）、敗血症の診断薬としてなり得なかった。

【0005】

発明者らはLandmannらが報告した上記約55kDaと49kDaの2種等の可溶型CD14（高分子量CD14（報告により、その分子量は異なるため、約55kDa

、49kDaに限定されるわけではない、以下同））とは別に、約36kDaの可溶型低分子量CD14が血中に存在すること、また該可溶型低分子量CD14の測定が臨床上有用であること、その測定法として、血中可溶型CD14総量から、血中高分子量CD14量を差し引くことを提案している（特許文献2参照）。

## 【0006】

【特許文献1】西獨国特許出願公開第286876号明細書

【特許文献2】国際公開第WO01/22085号パンフレット

【非特許文献1】「サイエンス（Science）」、（米国）、1990年、第249巻、p. 1431-1433

【非特許文献2】「ヌクレオツク アシッド リサーチ（Nucleic Acid Research）」、（英国）、1988年、16巻、p. 4173

【非特許文献3】「ヨーロピアン ジャーナル オブ イムノロジー（European Journal of Immunology）」、（独国）、1993年、第23巻、p. 2144-2151

【非特許文献4】「ザ ジャーナル オブ インフェクションズ ディジーズ（The Journal of Infectious Disease）」、（米国）、1995年、第171巻、p. 639-644

【非特許文献5】「ヨーロピアン ジャーナル オブ バイオケミストリー（European Journal of Biochemistry）」、（独国）、1996年、第236巻、p. 457-464

## 【0007】

【非特許文献6】「ヨーロピアン ジャーナル オブ イムノロジー（European Journal of Immunology）」、（独国）、1995年、第25巻、p. 604-610

【非特許文献7】「ヨーロピアン ジャーナル オブ イムノロジー（European Journal of Immunology）」、（独国）、1986年、第16巻、p. 1583-1589

【非特許文献8】「アレルギー ウント イムノロジー（Allergie und Immunologie）」、（独国）、1988年、第34巻、p. 17-26

【非特許文献9】「ジャーナル オブ イクスペリメンタル メディisin（Journal of Experimental Medicine）」、（米国）、1983年、第158巻、p. 126-145

【非特許文献10】「モレキュラー イムノロジー（Molecular Immunology）」、（英国）、1989年、第26巻、p. 657-662頁

## 【0008】

【非特許文献11】「ジャーナル オブ イムノジカル メソッズ（Journal of Immunological Methods）」、（蘭国）、1992年、第155巻、p. 225-232

【非特許文献12】「クリニカル イムノロジー アンド イムノパソロジー（Clinical Immunology And Immunopathology）」、（米国）、1996年 第80巻、p. 307-310

【非特許文献13】「臨床検査」、1994年、第38巻、p. 341-344

【非特許文献14】「インフェクション アンド イムニティ（Infection and Immunity）」、（米国）、1999年、第67巻、p. 417-420頁

【非特許文献15】「クリニカル アンド イクスペリメンタル イムノロジー（Clinical and Experimental Immunology）」、（英國）、2000年、第120巻、p. 483-487

## 【0009】

【非特許文献16】「クリニカル アンド イクスペリメンタル イムノロジー（C

clinical Experimental Immunology」、(英國)、1994年、第96巻、p. 15-19

【非特許文献17】「ペディアトリック アレルギー アンド イムノロジー (Pediatric allergy and immunology)」、(デンマーク)、1997年、第8巻、p. 194-199

【非特許文献18】「ヨーロピアン ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲーション (European Journal of Clinical Investigation)」、(英國)、1998年 第28巻、p. 672-678  
【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

かかる状況下において、敗血症患者の診断に有用である、ヒト低分子量CD14を高感度、簡便かつ特異的に定性又は定量する測定方法及びその測定キットが望まれている。さらには、その測定方法に有用な該ヒト低分子量CD14に対する特異的な抗体が望まれている。

【課題を解決するための手段】

【0011】

発明者等は鋭意研究の結果、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体を発明した。また該抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法によるヒト低分子量CD14を特異的に測定する方法を発明し、該抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法により測定することを特徴とするヒト低分子量CD14測定キットを発明した。さらに該測定キットを用いたヒト低分子量CD14の測定は、敗血症の診断の指標として有用であることを明らかにした。さらに、敗血症の新規な診断方法を発明した。

【0012】

すなわち、本発明は、以下の新規な抗体、及びヒト低分子量CD14の測定キットを提供する。

- (1) 配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体。
- (2) サンドイッチ免疫測定法により測定することを特徴とする、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体または該抗体の断片を含む、ヒト低分子量CD14測定キット。
- (3) 該配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体または該抗体の断片を不溶性担体に結合した抗体または該抗体の断片として含み、さらに標識したヒト低分子量CD14に結合する物質を第二の結合物質として含む(2)のキット。
- (4) 該配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体または該抗体の断片が標識されていることを特徴とし、さらにヒト低分子量CD14に結合する物質を第二の結合物質として不溶性担体に結合して含む(2)のキット。
- (5) 該抗体の断片が、16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体のFab、Fab'、若しくはF(ab')2である(2)～(4)のいずれかのキット。
- (6) 該ヒト低分子量CD14に結合する物質が、ヒト低分子量CD14に結合する抗体である(3)若しくは(4)のキット。
- (7) 該ヒト低分子量CD14に結合する抗体が、モノクローナル抗体である(6)のキット。
- (8) 該ヒト低分子量CD14に結合する物質が、ヒト低分子量CD14に結合する抗体の断片である(3)若しくは(4)のキット。
- (9) 該ヒト低分子量CD14に結合する抗体の断片が、ヒト低分子量CD14に結合する抗体のFab、Fab'、若しくはF(ab')2である(8)のキット。
- (10) 競合法によるサンドイッチ免疫測定法により測定することを特徴とする、標識したヒト低分子量CD14若しくは標識したヒト低分子量CD14類似物質を含む(2)のキット。
- (11) 標識が、酵素、色素、金コロイド、着色ラテックス、化学発光物質、蛍光物質ま

たはアイソトープの少なくとも一つによる標識であることを特徴とする(2)～(10)のいずれかのキット。

(12) 該サンドイッチ免疫測定法がイムノクロマト法を利用した測定法であることを特徴とする(2)～(10)のいずれかのキット。

(13) 該サンドイッチ免疫測定法がフロースルー法を利用した測定法であることを特徴とする(2)～(10)のいずれかのキット。

#### 【0013】

また、以下のヒト低分子量CD14の測定方法及び敗血症の新規な診断方法を提供する。

(14) 上記(1)の抗体を使用することを特徴とするサンドイッチ免疫測定法により測定するヒト低分子量CD14の測定方法。

(15) 該測定方法が競合法によるサンドイッチ免疫測定法である(14)の測定方法。

(16) 低分子量CD14を直接測定することを特徴とする敗血症の診断方法。

#### 【発明の効果】

#### 【0014】

本発明は、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体を提供し、これを用いてサンドイッチ免疫測定法により測定するヒト低分子量CD14測定キット及びその測定方法を提供する。さらに該キットを用いた敗血症の新規な診断方法を提供する。本発明のキットは、ヒト低分子量CD14を高感度、簡便かつ特異的に定性又は定量でき、敗血症患者の診断に有用である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0015】

以下に、より詳細に本発明を説明する。

本発明で記載する「ヒト低分子量CD14」とは、ヒト血中に存在する可溶型蛋白質であり、ゲルfiltrationでは分子量35～45kDaである。また、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体と結合し、さらに、ヒト高分子量CD14と結合する抗CD14抗体の一部の抗体と結合する蛋白質である。抗CD14抗体の一部の抗体とは、例えば配列番号2に記載のヒトCD14の17番から26番の領域を認識する抗体、3C10等である。また、上記配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体と上記配列番号2に記載のヒトCD14の17番から26番の領域を認識する抗体とが同時に結合することができる蛋白質である。具体的な一例としては、WO01/22085号公報に記載の分子量約36kDaのヒト血中蛋白質を例示することができる。(以降、「ヒト」を省略し、低分子量CD14と記載することがある)

「ヒト低分子量CD14」は上記の通り示されるが、1種の蛋白質若しくは多種の蛋白質群として血中に存在する。さらに特徴として、正常人と比較して敗血症患者の血中に多く存在する。

#### 【0016】

本発明で記載する「ヒト高分子量CD14」とは、ヒト血中に存在する可溶型CD14蛋白質であり、配列番号2に記載のヒトCD14全長、若しくはその全長から41アミノ酸以下のC末端がプロセシングされたヒトCD14である。これらは先行技術の欄に記載したLandmannらの報告に記載される約55kDa、及び約49kDaの可溶型CD14が含まれる。(以降、「ヒト」を省略し、高分子量CD14と記載することがあるが、報告により、その分子量は異なるため、約55kDa、49kDaに限定されるわけではない、以下同じ。)

#### 【0017】

本発明の第一の態様は、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体である。

本発明の抗体は、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する。配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合すれば、抗体が結合する領域はペプチドのいずれの領域でもよく、特に限定されない。

配列番号1に記載の16アミノ酸残基のアミノ酸配列は、配列番号2に記載のヒトCD14の53番から68番までの16アミノ酸残基に該当し、現在ヒト蛋白質においてヒトCD14以外に該配列を有する他の蛋白質は知られておらず、ヒトCD14に特異的に含まれる配列である。

本発明の抗体はその特徴として、ヒト低分子量CD14に結合する。その特徴により、本発明の第二の態様のキット、本発明の第三の態様の測定方法に利用できる。

#### 【0018】

本明細書で記載する「配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する」とは、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドを抗原として特異的に結合し、通常の抗原抗体反応を示すことをいう。抗原抗体反応を示すことは、凝集法、サンドイッチ法、固相直接法または固相結合法、競合法等で確認できる。

本発明の抗体は、該ペプチド若しくは低分子量CD14に対する親和性として表した場合の解離乗数(KD)は、 $10^{-7}M$ 未満が好ましい。より好ましくは、 $10^{-8}M$ 以下、さらに好ましくは $10^{-9}M$ 以下である抗体である。

#### 【0019】

本発明の抗体はポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。本発明の抗体が由来する動物種は特に限定されない。抗体作成の容易さの面では、ウサギ、ヤギ等が好ましい。また分子種は特に限定されない。いずれのクラス、サブクラス及びアイソタイプに分類される免疫グロブリンであってもよい。

#### 【0020】

本発明の抗体の作成において、ヒトCD14由来のペプチドが抗原として重要である。ヒトCD14由来のペプチドとは、配列番号1に記載のアミノ酸残基の連続した8個以上のアミノ酸を含むペプチドであり、好ましくは、連続した10個以上、より好ましくは連続した12個以上、特に好ましくは連続した16個のアミノ酸を含むペプチドである。また、ペプチドのアミノ酸残基の上限には特に限定はないが、作成された抗体の有する低分子量CD14に対する特異性を増すために上限は16個が好ましい。さらに、ペプチドは配列番号1に記載のアミノ酸残基の連続した8個以上のアミノ酸を含めば、その他のアミノ酸配列に限定はないが、好ましくはペプチドすべてのアミノ酸配列が配列番号1に記載のアミノ酸配列由来であることである。

#### 【0021】

本発明の抗体は、好ましくは配列番号1に記載のアミノ酸残基の連続した8個以上のアミノ酸を含むペプチドを抗原として作成した抗体である。好ましくは連続した10個以上、より好ましくは連続した12個以上、特に好ましくは連続した16個のアミノ酸を含むペプチドを抗原として作成した抗体である。

#### 【0022】

上記ペプチドは分子量が小さいため、通常免疫原性を持たない。このためキャリアと結合させて若しくはMultiple Antigen Peptide (MAP) 法を用いてMAPペプチドを調製して、免疫原性を有する分子量を有させ、免疫原とすればよい。

上記ペプチドと結合させるキャリアは、キャリア蛋白、ポリマーが挙げられる。キャリア蛋白は牛血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、サイログロブリンまたはオボアルブミン等の異種蛋白を用いればよい。これらキャリア蛋白は、ペプチド若しくはキャリア蛋白のアミノ酸に含まれる側鎖の官能基を利用して、またはマレイミド基、N-ヒドロキシスクシニミド (NHS) 基若しくはアルデヒド基を導入して、上記ペプチドと結合させればよい。ポリマーはマンナン若しくはキトサン等の糖類、ポリビニルピロリドン (PVA) が挙げられる。これらポリマーは上記ペプチドと、吸着若しくは上記のような化学結合により結合させればよい。

#### 【0023】

本発明の抗体は公知技術を用いることにより作製できる（例えば、免疫実験操作法、日本免疫学会編、日本免疫学会発行、参照）。例えばポリクローナル抗体は下記の方法で作

製できる。

上記のとおり調製した免疫原 20～1000 μgをフロインド完全アジュバント、RIBIアジュバント、ALUM等のアジュバントと混合し、各種動物に免疫することができる。各種動物としては馬、羊、ヤギ、ブタ、ウサギ、ラット、マウス等が使用可能である。免疫方法としては筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、リンパ節投与等の方法が使用可能であり、初回投与後1～4週間間隔でフロインド不完全アジュバント、RIBIアジュバント、ALUM等のアジュバントと混合した免疫原を同様に投与することにより、あるいは免疫原を直接静脈内に投与することにより追加免疫を行うことができる。抗血清は、免疫した動物から通常の採血方法、例えば頸動脈、耳静脈、心臓、足の静脈等より血液を採取し、遠心等により血清を分離することにより調製することができる。得られた抗血清は硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム等を添加する塩析法によりγグロブリン分画を沈殿させ、適当な緩衝液に透析後、プロテインA、プロテインG等のγグロブリンを特異的に精製することができるアフィニティーマトリクスを用いて目的のペプチドに対する IgG画分の精製ポリクローナル抗体を調製することができる。また、上記免疫源としたペプチドと結合する抗体を選択することにより、特異精製することができる。

#### 【0024】

また、モノクローナル抗体は下記の方法で作製できる。

配列番号1に示されるアミノ酸残基の連続した8個以上のアミノ酸からなるペプチドを免疫原として免疫した哺乳動物の免疫細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製し、このハイブリドーマの中から、上記ペプチドと結合する抗体を産生するクローンを選択することにより、本発明の抗体を作製することができる。好ましくは、53番から68番までのアミノ酸残基の連続した10個以上からなるペプチドを免疫原とすることである。より好ましくは連続した12個以上、特に好ましくは連続した16個のアミノ酸からなるペプチドを免疫原とすることである。

免疫する哺乳動物は、特に限定されないが、細胞融合に使用するミエローマ細胞との適合性を考慮して選択することができる。マウス、ラットまたはハムスター等が好ましい。ミエローマ細胞は、公知の種々の細胞が使用可能である。これにはP3、P3U1、SP2/O、NS-1、YB2/0及びY3-Ag1, 2, 3等の骨髄種細胞が含まれる。

#### 【0025】

免疫は公知の方法により行うことができる。例えば、抗原を腹腔内、皮下、静脈内またはフットパッド内に投与して行う。この抗原の投与はアジュバントを併用してもよく、また複数回投与することが好ましい。免疫細胞は抗原の最終投与の数日後、例えば3日後に、摘出した脾細胞またはリンパ節由来の細胞が好ましい。免疫細胞とミエローマ細胞との融合は、Milestone等の方法 (Methods in Enzymol., 73巻3頁) 等の公知の方法を用いて行うことができる。例えば、融合剤としてポリエチレングリコール (PEG) を使用する方法または電気融合法等が挙げられる。免疫細胞とミエローマ細胞との混合比は、それらが融合できる比率であれば限定されないが、免疫細胞に対し、ミエローマ細胞を1/10量ないし等量を使用することが好ましい。PEG (平均分子量1,000～4,000) を使用して細胞融合を行う方法ではPEG濃度は特に限定されないが50%で行うことが好ましい。また、融合効率促進剤としてジメチルスルフォキシド (DMSO) 等の補助剤を添加してもよい。融合は37℃に加温したPEG溶液を混合した細胞に添加することにより開始し、1～5分間反応後、培地を添加することにより終了する。この融合により形成されたハイブリドーマをヒポキサンチン、チミジン及びアミノブテリンを含む培地 (HAT培地) 等の選択培地で1日～7日間培養し、未融合細胞と分離する。

#### 【0026】

得られたハイブリドーマをその産生する抗体により更に選択する。選択したハイブリドーマを公知の限界希釈法に従って単一クローン化し、単一クローン性抗体産生ハイブリドーマとして樹立する。ハイブリドーマの産生する抗体の活性を検出する方法は公知の方法を使用することができる。例えばELISA法、凝集反応法、ラジオイムノアッセイ法が

挙げられる。樹立したハイブリドーマを公知の方法で培養し、その培養上清よりモノクローナル抗体を得ることができる。また、ハイブリドーマをこれと適合性を有する哺乳動物に投与して増殖し、その腹水より得ることができる。抗体の精製は、塩析法、ゲルfiltration法、イオン交換クロマト法またはアフィニティーコロマト法等の公知の精製手段を用いて行うことができる。

【0027】

免疫原とするペプチドの作成方法は、一般的に使用されるペプチド合成機（ペプチドシンセサイザー433A型、パーキンエルマージャパン）等を用いた方法、遺伝子組換え法（東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコール、秀潤社）等が挙げられる。

例えば、配列番号1に記載のアミノ酸残基の連続した8個以上のアミノ酸からなるペプチドは433A型ペプチド合成機を用いてFmoc法により合成でき、TFAによる脱保護、樹脂からの切断の後、C18 HPLCカラム（Capcell-pak、資生堂）を用いて精製し、目的のペプチドを調製することができる。

【0028】

本発明の第二の態様は、サンドイッチ免疫測定法により測定することを特徴とする、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体または該抗体の断片を含む、ヒト低分子量CD14測定キットである。

該抗体の断片とは、16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体のFab、Fab'、若しくはF(ab')2である。

本発明のキットは、サンドイッチ免疫測定法により測定することを特徴とする。サンドイッチ免疫測定法は公知の技術を利用することができる。測定法の原理、応用及び改良法については、例えば、超高感度酵素免疫測定法 石川栄治著、学会出版センター（1993年）、免疫測定法の新しい活用事例と診断試薬・治療薬開発への応用 免疫測定法開発研究会、経営教育出版、酵素免疫測定法（第3版） 石川栄治等編、医学書院（1987年）に記載されている。

また、本発明のキットは配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体を含むことを特徴とする。該配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体の特徴、及び作成法等は本発明の第一の態様に記載した通りである。該抗体は、ポリクローナル抗体でも、モノクローナル抗体でもよく、特に限定されない。

サンドイッチ免疫測定法は、通常測定する蛋白質を認識する部位の異なる2種類以上の抗体を用いて抗体-抗原-抗体複合体を形成させることにより測定する方法である。

まず、第一の抗体が結合した不溶性担体を用意し、固相若しくは反応場所とする。検体を固相の該不溶性担体に添加し、反応させる。一定時間反応させた後、洗浄して固相に結合しなかった物質を除去する。続いて標識した第二の抗体を添加する。一定時間反応させた後、洗浄して複合体を形成しなかった標識抗体を除去し、標識物に基づいて固相に結合した複合体の量を特異的に定性または定量する。サンドイッチ法は上記のように2段階で行う方法（2ステップ法）と抗原及び標識抗体を同時に加える1段階法（1ステップ法）のどちらを使用することもできる。

【0029】

本発明のキットにおいては、「配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体」-ヒト低分子量CD14-「ヒト低分子量CD14に結合する第二の結合物質」複合体を形成させることにより測定することを特徴とする。

本発明のキットの構成としては、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体が結合した不溶性担体、及び標識した低分子量CD14に結合する第二の結合物質（以下、単に、第二の結合物質と記載することがある）を含むこと、あるいは、第二の結合物質が結合した不溶性担体、及び標識した配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体を含むこと、を特徴とする。

【0030】

第二の結合物質の例示としては、低分子量CD14に結合する抗体が挙げられる。該低

分子量CD14に結合する抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、特に限定されないが、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体を用いるサンドイッチ免疫測定法における相性の点では、モノクローナル抗体が好ましい。また、該モノクローナル抗体の断片であってもよい。抗体の断片とは、該モノクローナル抗体のFab、Fab'、若しくはF(ab')2である。

低分子量CD14に結合する抗体（以下、第二の抗体と記載することもある）は、低分子量CD14と特異的に結合する抗体でも、高分子量CD14とも結合する抗体でもよく、特に限定されない。

#### 【0031】

作成法は、例えば高分子量CD14、低分子量CD14、高分子量CD14及び低分子量CD14の混合物若しくは組換体CD14を抗原として、本発明の第一の態様に記載の方法と同様にポリクローナル抗体若しくはモノクローナル抗体を作成すればよい。高分子量CD14及び低分子量CD14の混合物、及び組換体CD14を抗原とした第二の抗体の作成法の例示を後述する実施例3に示した。

また、実際の測定をする前に予備的に、後述する実施例3と同様に、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体と第二の抗体の候補の抗体とサンドイッチ法の系を構成し、測定感度を確認して、第二の抗体を選択することが好ましい。

また、抗体の断片であるFab、Fab'、F(ab')2は公知の方法（超高感度酵素免疫測定法 石川栄治著 25-40頁、学会出版センター、1993年）で作製できる。

#### 【0032】

サンドイッチ免疫測定法において、上記の別法として競合法により測定することもできる。抗体-抗原-抗体複合体を形成させる中で、検体中の抗原と標識した抗原若しくは標識した抗原類似物質を競合させることにより測定する方法である。

本発明のキットにおいては、「配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体」-標識ヒト低分子量CD14（若しくはその類似物質）-「ヒト低分子量CD14に結合する第二の結合物質」複合体を形成させることにより測定することを特徴とする。

本発明のキットの競合法の構成としては、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体が結合した不溶性担体、第二の結合物質、及び標識したヒト低分子量CD14若しくは標識したヒト低分子量CD14類似物質を含むこと、あるいは、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体、第二の結合物質が結合した不溶性担体、及び標識したヒト低分子量CD14若しくは標識したヒト低分子量CD14類似物質を含むこと、を特徴とする。

#### 【0033】

ヒト低分子量CD14の調製方法は、WO01/72993号公報の実施例16に記載されている。

ヒト低分子量CD14類似物質とは、例えば、ヒトCD14のN末端1～285番目のアミノ酸を有する可溶性ポリペプチド（以下、sCD14(1-285)と記載）及びヒトCD14のN末端1～307番目のアミノ酸を有しあつ286番目のセリンをシステインに置換した組換えポリペプチド（以下、sCD14(1-307)S286Cと記載）が例示される。しかし、測定系において検体中のヒト低分子量CD14と競合可能な物質である限り、特に限定されない。sCD14(1-285)及びsCD14(1-307)S286Cの調整法は、WO01/72993号公報に記載されている。

#### 【0034】

また、サンドイッチ免疫測定法において、さらに別法として第二の特異結合を利用して測定することもできる。抗体-抗原-抗体-第二の特異結合物質-第二の特異結合物質の特異結合パートナー（以下、第二の特異結合パートナーと記載することがある）の複合体を形成させて測定する方法である。

本発明のキットにおいては、「配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチド

と結合する抗体」—ヒト低分子量CD14—「ヒト低分子量CD14に結合する第二の結合物質」—第二の特異結合物質—第二の特異結合パートナーの複合体を形成させること、若しくは、「ヒト低分子量CD14に結合する第二の結合物質」—ヒト低分子量CD14—「配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体」—第二の特異結合物質—第二の特異結合パートナーの複合体を形成させることにより測定することを特徴とする。

本発明のキットの第二の特異結合を利用した構成としては、第二の特異結合物質で標識した配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体、標識した低分子量CD14に結合する第二の結合物質、及び第二の特異結合パートナーが結合した不溶性担体を含むこと、

あるいは、標識した配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体、第二の特異結合物質で標識した低分子量CD14に結合する第二の結合物質、及び第二の特異結合パートナーが結合した不溶性担体を含むこと、を特徴とする。

第二の特異結合物質—第二の特異結合パートナーの組み合わせとしては、抗原とその抗体、リガンドとそのレセプター、糖鎖含有物質とレクチン、ビオチンとアビジン若しくはストレプトアビジン等が挙げられる。

#### 【0035】

さらに、サンドイッチ免疫測定法において、抗体に対する抗体、すなわち、抗イムノグロブリン抗体を利用して、抗体—抗原—抗体—抗イムノグロブリン抗体の複合体を形成させて測定する方法、また、抗イムノグロブリン抗体及び第二の特異結合を利用して、抗イムノグロブリン抗体—抗体—抗原—抗体—第二の特異結合物質—第二の特異結合パートナー等を形成させて測定する方法が例示される。

本発明のキットにおいては、「配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体」—ヒト低分子量CD14—「ヒト低分子量CD14に結合する第二の結合物質」—抗イムノグロブリン抗体の複合体を形成させること、「配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体」—ヒト低分子量CD14—「ヒト低分子量CD14に結合する第二の結合物質」—抗イムノグロブリン抗体の複合体を形成させること、若しくは抗イムノグロブリン抗体—「配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体」—ヒト低分子量CD14—「ヒト低分子量CD14に結合する第二の結合物質」—第二の特異結合物質—第二の特異結合パートナーを形成させること、若しくは抗イムノグロブリン抗体—「ヒト低分子量CD14に結合する第二の結合物質」—ヒト低分子量CD14—「配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体」—第二の特異結合物質—第二の特異結合パートナーを形成させること等により測定することを特徴とする。

#### 【0036】

いずれのサンドイッチ免疫測定法にしても、「配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体」—ヒト低分子量CD14—「ヒト低分子量CD14に結合する第二の結合物質」を含む複合体を形成させることにより測定することを特徴とする測定法であれば、第二の特異結合を利用して、固相、標識物質等を作成しても、本発明の測定法に含まれる。

すなわち、いずれのサンドイッチ免疫測定法にしても、該測定法のキットとして、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体を含む限り、本発明のキットに含まれる。

#### 【0037】

本発明のキットに用いる不溶性担体は、ビーズ、ラテックス粒子、磁性粒子、プレート、チューブまたはメンブレン等を用いればよい。ビーズ、プレートまたはチューブは、その材料としてポリスチレン、ナイロン、ガラス、シリコンラバー、ステンレス、プラスチック等が挙げられる。メンブレンは、セルロース、セルロース誘導体、ニトロセルロース、多孔性合成ポリマー、グラスファイバー、布、不織布、滤紙等が挙げられる。形状としては、ビーズ、ラテックス粒子または磁性粒子等は球形として用いることができる。保存

時のスペースの確保の点で有利である。プレートまたはチューブはウエル形として用いることができる。市販の自動化測定器、プレートリーダー等に対応可能な点で有利である。また、メンブレンは後述するイムノクロマト法、フロースルーフ法に用いることができる。

配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体、第二の結合物質、第二の特異結合物質若しくはそのパートナー、または抗イムノグロブリン抗体の不溶性担体への結合は熱吸着法、化学結合法等により行うことができる。

また、不溶性担体に上記物質が結合していない非吸着面に対して、測定系に影響しない物質でブロッキング処理することが好ましい。測定系の特異性若しくは感度をあげることができるからである。測定系に影響しない物質とはBSA、カゼイン等の蛋白質及びTween 20、NP-40等の界面活性剤等が例示される。

#### 【0038】

本発明のキットに用いる標識は、ペルオキシダーゼ、アルカリフェオスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、オキシダーゼ及びウロキナーゼ等の酵素、アクリジニウム若しくはその誘導体、またはエクオリン若しくはその変体等の化学発光物質、FITC等の蛍光物質、色素、金コロイド、着色ラテックス、あるいはアイソトープを用いればよい。

#### 【0039】

例えば酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合は、発色基質として3, 3', 5, 5'-テトラベンジンまたは1, 2-フェニレンジアミン等が、アルカリフェオスファターゼを用いる場合は、発色基質として4-ニトロフェニルフェオスフェート等が、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は、発色基質として2-ニトロフェニル・ $\beta$ -D-ガラクトシド等が例示される。

配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体、第二の結合物質、第二の特異結合物質若しくはそのパートナー、または抗イムノグロブリン抗体への酵素標識は、二段階グルタルアルデヒド法、過ヨーン酸法、マレイミド法、ピリジル・ジスルフィド法等により行うことができる。

酵素以外の標識についても熱吸着法、化学結合法等の公知の技術を利用して行うことができる。

酵素標識は、上記に例示される様な発色基質を用いれば、通常の吸光度測定系を用いて測定でき、また感度も比較的高く好ましい。また、簡易な測定キット、例えば後述するイムノクロマト法、フロースルーフ法を利用したキットに用いる標識は、色素、金コロイド若しくは着色ラテックスが視覚的にも観察可能であるので好ましい。

#### 【0040】

本発明のキットは、サンドイッチ免疫測定法により測定することを特徴とし、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体を含むことを特徴とするものである。サンドイッチ免疫測定法は上記した通り公知の技術を利用することができ、上記の具体的な説明の他、サンドイッチ免疫測定法を特徴としたキットであれば、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体を含む限り、本発明のキットに含まれ、特に限定されない。すなわち、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体、及びサンドイッチ免疫測定法に必要な試薬が含まれていれば良く、また測定原理に基づく測定結果を阻害しない限り、含まれるものは限定されない。

例えば、任意の構成要素として、検体若しくは標識抗体等の緩衝液若しくは希釈剤、標識抗体に酵素が使われる場合の酵素に適した発色基質（上記参照）、ブロッキング剤、反応停止剤または洗浄剤等が例示される。また標準物質も例示される。標準物質はヒト低分子量CD14、低分子量CD14類似物質が挙げられる。

#### 【0041】

また、本発明のキットは、サンドイッチ免疫測定法を測定原理とするイムノクロマト法またはフロースルーフ法を利用したキットも含まれる。

イムノクロマト法は、試験ストリップ上を、検体中の溶液と共に被検物質である抗原が、試験ストリップ中に移動可能のように配置された標識抗体と反応しながら、抗体が固相化されている不溶性担体に移動し、不溶性担体上に抗体-抗原-抗体複合体を形成させる

方法である。通常試験ストリップに検体を滴下する1ステップにより測定できる。

例えば、特開平1-63865、WO88/08534、WO90/09592にイムノクロマト法の装置が開示されている。また、展開速度の異なる流路を有するイムノクロマト法の装置が、WO89/03993、WO99/27364に開示されており、例えば固相抗体と抗原との反応しその複合体形成後、標識抗体が反応可能なように応用できる。

#### 【0042】

本発明のキットのイムノクロマト法を利用した例を以下に示す。

例えば、装置すなわちキットとしては、試料添加部、試薬部、検出部及び吸収部を、試料添加部に添加される液性検体が上記の順に移動するように設けた試験ストリップである。試薬部に標識した第二の結合物質を含浸させ、検出部に配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体が結合した不溶性担体を設置されればよい。

試料添加部に添加された検体は、試薬部で標識した第二の結合物質を吸収する。ヒト低分子量CD14と標識した第二の結合物質が反応し、複合体を形成しながら、検出部に進む。検出部で上記の複合体と配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体が反応し、不溶性担体上に「配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体」—ヒト低分子量CD14—「ヒト低分子量CD14に結合する第二の結合物質」複合体が形成される。反応に関わらない検体中の物質及び試薬は、吸収部に移動する。検出部に形成された複合体の標識を測定、特に視覚的に測定すればよい。

#### 【0043】

試験ストリップは、多孔性担体等を用いることが例示される。多孔性担体は、例えばニトロセルロース、セルロース、セルロース誘導体、ナイロン、ナイロン繊維、ガラス線維、多孔性合成ポリマー等が挙げられる。

試料添加部、試薬部は、試験ストリップの一部をそのまま利用してもよく、また試料量若しくは試薬量に応じたセルロース濾紙、グラスファイバー、布、不織布または多孔性合成ポリマー等を用いることが例示される。

検出部は、上記した通り、セルロース、セルロース誘導体、ニトロセルロース、多孔性合成ポリマー、グラスファイバー、布、不織布、濾紙等を用いることが例示される。

吸収部は、水吸収性材料を用いることが例示される。水吸収性材料とは、例えばスポンジ等の吸収性ポリマー、セルロース濾紙、濾紙等が挙げられる。

#### 【0044】

以上はイムノクロマト法の一例であり、反応が進行したことを確認する対照部を追加したり、試験ストリップに支持体をつけたり、外部カバーで覆ったりしてもよく、本発明のキットはこれらに限定されるものではない。

#### 【0045】

また、上記のサンドイッチ免疫測定法に関する説明に記載した通り、不溶性担体上に「配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体」—ヒト低分子量CD14—「ヒト低分子量CD14に結合する第二の結合物質」複合体を形成させる他、抗イムノグロブリン抗体、第二の特異結合を利用した複合体を形成させて測定するイムノクロマト法のキットも本発明のキットに含まれる。

#### 【0046】

フロースルー法は、不溶性担体であるメンブレン上で、検体中の溶液と共に被検物質である抗原が、抗体-抗原-抗体複合体が形成させる方法である。このとき、メンブレンに固定されなかった物質は、通常は垂直にメンブレンの表から裏を通って除去される。

メンブレン上に検体、試薬及び洗浄剤を滴下する多ステップ法の装置がWO88/01603に開示されている。

また、メンブレンを多層にし、試薬部を設け、検体のみを滴下すれば測定できる1ステップに改良した方法が、特開平6-273419に開示されている。

#### 【0047】

本発明のキットのフロースルー法を利用した例を以下に示す。

例えば、装置すなわちキットとしては、試料添加部、試薬部、検出部及び吸収部を、試料添加部に添加される液性検体が上記の順に移動するよう重ねて設けたキットである。試薬部に標識した第二の結合物質を含浸させ、検出部に配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体が結合した不溶性担体を設置されればよい。

試料添加部に添加された検体は、試料添加部を垂直にメンブレンの表から裏を通って（以下、試料の移動は同様）、試薬部で標識した第二の結合物質を吸収する。ヒト低分子量CD14と標識した第二の結合物質が反応し、複合体を形成しながら、検出部に移動する。検出部で上記の複合体と配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体が反応し、不溶性担体上に「配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体」—ヒト低分子量CD14—「ヒト低分子量CD14に結合する第二の結合物質」複合体が形成される。反応に関わらない検体中の物質及び試薬は、吸収部に移動する。検出部に形成された複合体の標識を測定、特に視覚的に測定すればよい。検出部を、試料添加部及び試薬部と、若しくは吸収部と分離可能な装置にしておけば、簡単に目視できる。また、試料添加部及び試薬部を半透明な部材であれば、試料添加部側から目視でき、特開平6-273419の様に吸収部を検出部の上方（試料添加部側）に配置すれば、下方側から目視できる。

#### 【0048】

部材は、イムノクロマト法と同様の部材を用いることができ、各部材をメンブレン様にして、検体中の溶液が移動できるようにしておけばよい。

#### 【0049】

以上はフロースルー法の一例であり、反応が進行したことを確認する対照部を追加したり、各部材に支持体をつけたり、外部カバーで覆ったりしてもよく、本発明のキットはこれらに限定されるものではない。

#### 【0050】

また、上記のサンドイッチ免疫測定法に関する説明に記載した通り、不溶性担体上に「配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体」—ヒト低分子量CD14—「ヒト低分子量CD14に結合する第二の結合物質」複合体を形成させる他、抗イムノグロブリン抗体、第二の特異結合を利用した複合体を形成させて測定するフロースルー法のキットも本発明のキットに含まれる。

#### 【0051】

さらに、本発明のキットは、標識の信号を電気化学的に測定するMEDIA法（特開平5-264552）による測定、マイクロチップを使用したイムノアッセイ法（バイオサイエンスとインダストリー 61巻 449-454頁 2003年）による測定にも利用可能である。これらの原理を用いた測定キットも、サンドイッチ免疫測定法により測定することを特徴とし、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体を含む限り、本発明のキットに含まれる。

#### 【0052】

本発明のキットは、配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体を含むことを特徴としており、低分子量CD14を特異的に測定できる。本発明のキットに使用する検体は、水性の検体が好ましい。特に血液、血清若しくは血漿等の血液成分、尿、その他の体液、細胞培養上清、またはカラム溶出液等が好ましく、これらに含まれる低分子量CD14の測定に有用である。しかし、ヒトの血液成分以外からの検体、例えばヒト尿若しくはその他の体液、ヒト以外の種からの血液成分、尿若しくはその他の体液、細胞培養上清、またはカラム溶出液等の検体では、低分子量CD14だけではなく、低分子量CD14類似の蛋白質、ポリペプチド等も測定することが可能である。配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体を含む限り、上記の低分子量CD14類似の蛋白質、ポリペプチド等を測定するためのキットも、本発明のキットに含まれる。

また、以上の説明において、「配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体」の代わりに「配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと

結合する抗体の断片である  $Fab$ 、 $Fab'$ 、若しくは  $(Fab')$  2」を用いてもよい。

本発明のキットで特異的に測定できる低分子量  $CD14$  は、本発明の第一の態様の説明で記載した通り、敗血症の診断の指標となる。このため、本発明のキットは、敗血症の診断に有用である。

#### 【0053】

本発明の第三の態様は、本発明の第一の態様の抗体を使用することを特徴とするサンドイッチ免疫測定法により測定するヒト低分子量  $CD14$  の測定方法である。

本発明の測定方法は、サンドイッチ免疫測定法を特徴とするヒト低分子量  $CD14$  を測定する方法である。本発明の第一の態様の抗体を固相抗体、若しくは標識抗体等として使用することができる。また、第二の特異結合、抗イムノグロブリン抗体を利用した測定方法も含まれる。この場合、本発明の第一の態様の抗体は遊離の抗体、第二の特異結合物質若しくは第二の特異結合パートナーに結合した抗体等としても使用することができる。

本発明の測定方法は、サンドイッチ免疫測定法の非競合法、または競合法が可能であり、またイムノクロマト法、またはフロースルー法での測定も含まれる。

詳細は本発明の第二の態様に記載した通りである。

#### 【0054】

本発明の第四の態様は、低分子量  $CD14$  を直接測定することを特徴とする敗血症の診断方法である。本発明の敗血症の診断方法は、低分子量  $CD14$  を直接測定することを特徴とする。

低分子量  $CD14$  を直接測定する方法は、本発明の第三の態様に記載したとおりである。また本発明の第二の態様に記載したキットを用いて診断することができる。

#### 【0055】

後述する実施例 3、10 及び 11 に記載の通り、本発明のキットを用いて正常人及び各種患者の血中の低分子量  $CD14$  を測定したところ、敗血症患者の血中で特異的に低分子量  $CD14$  量が高いことが確認された。このことから、上記のキットを用いて測定した結果を、敗血症の診断の指標とすることができます。例えば、患者の血中の低分子量  $CD14$  の量を求め、これを正常人の測定結果の平均値をとる等により標準化した正常人の値または正常人の値の範囲と比較することにより行う。例えば、正常人の平均値 + 2 SD または 3 SD をカットオフ値として、それよりも低分子量  $CD14$  値が高い場合は陽性の指標とする等である。また、予め正常人および敗血症患者の低分子量  $CD14$  濃度の値またはその範囲を標準化した値と、各個体の低分子量  $CD14$  の測定値とを比較することにより診断の指標とすることもできる。例えば、正常人の低分子量  $CD14$  値を 0 ~ 0.1  $\mu g/mL$  とし、敗血症患者の値を 0.2  $\mu g/mL$  以上として測定値と比較し、陰性、擬陽性または陽性の指標とする等である。

#### 【実施例】

##### 【0056】

以下に、実施例をもって本発明を一層具体的に説明するが、これらは一例として示すものであり、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。また、以下の記載において用いる略号は当該分野において慣例として用いられる略号に基づくものである。また、アミノ酸配列のアミノ酸の番号は配列表の配列番号 1 に記載の番号を記載した。

##### 【0057】

(実施例 1) 合成ペプチドを免疫原としたポリクローナル抗体の作製

###### 1- (1) 免疫原とするペプチドの調製

配列番号 1 に記載の配列（配列番号 2 に記載の 53 番目から 68 番目の配列に該当）を有するペプチド（以下、S68ペプチドと記載）を、N末端で SH 基を介してキャリア蛋白質と結合させるため、N末端にシステインを挿入して合成した。すなわち、ペプチド合成機 ABI 433A（アプライド）を用いて、アミノ酸配列に従ってアミノ酸カラムを並べ、N末端にシステイン用のアミノ酸カラムを設置し自動合成を行った。合成したペプチドは定法により樹脂より切り出し、エーテルで沈殿させ回収後、再度蒸留水で溶解し凍結乾燥した。得られた粗精製ペプチドは溶解後、C18 逆相 HPLC (CAPCELL-P

AK、資生堂) を用いて5～70%のアセトニトリル濃度の直線グラジェントで溶出し、目的のペプチドを含む分画を回収した。回収した分画は凍結乾燥し、精製ペプチドとして2～3mgを得た。

#### 【0058】

##### 1-(2) 合成ペプチドを用いたペプチドキャリア抗原の調製

1-(1) で調製したペプチドをそれぞれ蒸留水で10mg/mlに溶解し、10mg/mlのマレイミド化キーホールリンベットヘモシアニン (Inject Maleimed Activated keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) (PIERCE) と等量混合した。室温で2時間反応後、生理食塩水で平衡化したNAP-10カラム (アマシャムバイオサイエンス) で脱塩し、S68ペプチドキャリア抗原 (以下、S68ペプチド-KLHと記載) を1mg得た。以下の実施例に記載の蛋白質濃度は使用したKLH量を液量で割ったものを使用した。

#### 【0059】

##### 1-(3) 合成ペプチドを免疫原としたポリクローナル抗体の作製

1-(2) で調製したS68ペプチド-KLHに対するポリクローナル抗体を作製するため、S68ペプチド-KLHを用いてウサギに免疫を行った。すなわち、S68ペプチド-KLH各100μgを500μlの生理食塩水に希釈し、500μlのフロイント完全アジュバント (DIFCO) と等量混合後、ニュージーランド白色ウサギ (北山ラベス) メス2. 1-2. 2kgの背部皮下に投与した。その2週間後、S68ペプチド-KLH各100μgを500μlの生理食塩水に希釈し、500μlのフロイント不完全アジュバント (DIFCO) と等量混合後、背部皮下に投与した。さらにその2週間後、S68ペプチド-KLH100μgを1mlの生理食塩水に希釈し耳静脈内に投与した。

#### 【0060】

投与終了1週間後、耳静脈より採血し、定法にしたがい抗血清を分離し、抗体を精製した。まず抗血清に最終飽和濃度33%となるように硫酸アンモニウムを添加し、4℃で1時間攪拌後、析出した沈殿を遠心分離した。次に沈殿を76mMリン酸緩衝液 (以下、PBS (pH 6.4) と記載) で溶解し、一夜透析した。透析液を濾過後、プロテインAカラム (プロセップA、ミリボア) にアプライし、結合したIgG画分を0.1Mグリシン塩酸緩衝液 (pH 3.0) により溶出し、精製抗体を得た。PBS (pH 6.4) で透析後、280nmの吸光度より蛋白質濃度を算出した (吸光係数: 0.533mg/mL)。以降、得られた抗体をS68ペプチドポリクローナル抗体と記載する。

#### 【0061】

##### 1-(4) 特異精製ポリクローナル抗体の調製

S68ペプチドポリクローナル抗体よりS68ペプチドに対する抗体のみを精製するため、以下の方法により特異精製を行った。まず、システインを挿入したS68ペプチド (以下、C-S68ペプチドと記載) をSH基を介して担体に結合させるため、マニュアルに従ってSulfolink Coupling Gel (PIERCE) 1mLあたりC-S68ペプチド200μgを混合し反応した。反応終了後残った活性基をブロッキングし、S68ペプチド結合アフィニティーカラムを調製した。次に、1-(3) に記載の精製IgG画分7.92mgをアプライし、リン酸緩衝液 (pH 7.4) (ダルベッコ、以下、D-PBS (pH 7.4) と記載) でカラムを洗浄し、次に0.1Mグリシン塩酸緩衝液 (pH 3.0) で結合した抗S68ペプチド抗体を溶出した。溶出後pHを中性に戻しPBSで透析後、蛋白質濃度を280nmの吸光度より算出した (吸光係数: 0.533mg/mL) ところ、0.52mgの抗S68ペプチド抗体 (以下、S68抗体と記載) が得られた。

#### 【0062】

##### (実施例2) 合成ペプチドを免疫原としたモノクローナル抗体の作製

1-(2) で調製したS68ペプチド-KLH20μgを100μLの生食に溶解し、フロイント完全アジュバント (DIFCO) と等量混合し、Wistarラット8週齢メスの各後足フットパッドに100μLづつ投与した。2週間後、腸骨リンパ節を摘出し細

胞融合を行った。細胞融合は安東民衛・千葉丈／著「単クローニング抗体実験操作入門」83ページ、1991年（講談社）にしたがって行った。すなわち、リンパ節よりセルストレインナー（ファルコン）を用いてリンパ球を分離し、ミエローマ細胞（Sp2/0-Ag14）と5:1で混合し、ポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行った。融合した細胞をHAT培地に懸濁し、ハイブリドーマを選別後、目的の抗体を產生しているハイブリドーマをスクリーニングした。

#### 【0063】

スクリーニングはsCD14(1-307)S286Cを直接プレートに固相化するELISA法を用いた。すなわち、イムノプレート（Maxisorb、NUNC）に0.1Mリン酸緩衝液（pH7.4）で1μg/mlに希釈したsCD14(1-307)S286Cを各ウエルに50μL添加し、37℃で1時間静置した。次にプレートをイオン交換水で5回洗浄後、0.1%BSAを含むPBS（pH6.4）を各ウエルに100μL添加し、室温で1時間静置してブロッキングを行った。得られたハイブリドーマからサンプリングした培養上清を各ウエルに添加し37℃で1時間反応させた後、0.05%Tween20を含む生理食塩水で3回洗浄した。次にペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体（DAKO）を10%ウサギ血清を含むPBSで1000倍に希釈した溶液を各ウエルに50μL添加した。37℃で1時間反応後、同様に5回洗浄しテトラメチルベンジジン溶液（TMB、BioFix）を各ウエルに添加した。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止した。450nmの吸光度をプレート分光光度計（NJ-2100、日本インターメッド）で測定し、sCD14(1-307)S286Cと結合する抗体を產生するハイブリドーマを含むウエルを選択した。

#### 【0064】

次に選択したウエルより安東民衛・千葉丈／著「単クローニング抗体実験操作入門」83ページ、1991年（講談社）にしたがって限界希釈法によりクローニングを行った。10日後、同様にsCD14(1-307)S286Cに対する反応性を指標としてスクリーニングを行い、6種類のハイブリドーマを選択した。選択したハイブリドーマを10%FCS/RPMI-1640培地（Sigma）で培養後、Hybridoma-SFM培地（Invitrogen）で培養し抗体を產生させ、プロテインGカラム（Prose p-G、ミリポア）を用いて抗体を精製した。精製したF1146-17-2抗体のサブタイプをラットタイピングキット（ZYMED）を用いて決定したところサブタイプはラットIgG2b・κであった。

なお、sCD14(1-307)S286Cは、WO01/72993号公報の実施例9に記載の方法を用いて調製した。

#### 【0065】

（実施例3）ヒト低分子量CD14の測定系の検討

実施例1及び実施例2に記載の抗体を用いて、サンドイッチELISA法によるヒト低分子量CD14の測定系を検討した。

#### 【0066】

##### 3-(1) 組換えヒトCD14の調製

まず、サンドイッチELISA法の第二の抗体とするsCD14(1-285)に対するモノクローナル抗体を作製するため、その免疫原であるsCD14(1-285)を大腸菌で調製した。sCD14(1-285)を大腸菌で発現させるために、以下の方法で発現プラスミドpTrp1659を構築した。まず、オリゴマー8, linkS (5'-AGC TTA GGA ATT T-3')（配列番号3）及びオリゴマー8, linkA (5'-CTA GAA ATT CCT A-3')（配列番号4）を合成した。これらのオリゴマーを等量混合し、99℃で1分間加温した後に、室温まで徐々に冷却してアニーリングを行った。さらにT4 Polynucleotide Kinaseで5末端をリン酸化してリンカーを作製した。次にセンスプライマー (5'-ACA TCT AGA TGA CCA CGC CAG AAC CT-3')（配列番号5）及びアンチセンスプライマー (5'-TTT GGA TCC TTA CTA GAG A

TC GAG CAC TCT-3') (配列番号6) を合成し、WO01/72993号公報の実施例8に記載のプラスミドpM1659を鋳型にPyrobest DNA polymeraseを用いてPCRを行った。反応液を90℃で2分間加温した後に、98℃ 10秒、55℃ 30秒、72℃ 1分のサイクルを30回繰り返して行った。

#### 【0067】

得られた約900bpの増幅物をXbaIとBamHIでdouble digest ionして、DNA断片を回収した。特開平06-025289号公報の実施例10に記載のベクターpM710をHindIIIとBamHIでdouble digestionした後に、アガロースゲル電気泳動を行い、回収した。前述したリン酸化済みリンカー、PCR増幅DNA断片/XbaI+BamHI消化断片、そしてベクター/HindII I+BamHI断片の3種をligationした後に(three-way ligation)、大腸菌コンピテントセル(JM109(TOYOB0))にtransformationを行い、目的のプラスミドを含むクローンを得た。プラスミドDNAは定法により調製した。

#### 【0068】

次にsCD14(1-285)を生産するためのJE7924形質転換株をエレクトロポレーション法により調製した。まず、大腸菌JE7924(J. Bacteriol 173 4799頁(1991))をグリセロールストックより回復し、LB培地にて37℃一晩培養した。さらに50mlのLB培地に植菌し直し、600nmの吸光度が0.5～0.6になるまで培養を続けた後に、培養フラスコごと30分間氷冷した。次に大腸菌を集菌し、氷冷した滅菌蒸留水にて2回、氷冷した10%グリセロール溶液で1回洗浄した後に、氷冷した10%のグリセロール溶液100μlに懸濁した。50μlずつ2本のチューブに分注して、液体窒素で急速凍結し、コンピテントセル(JE7924)を調製し、使用時まで-80℃で保存した。

#### 【0069】

次に、JE7924コンピテントセル50μlにpTrp1659約30ngをエレクトロポレーション法で導入した。機器はBIO-RAD社のGene Pulserを使用した。また、その時の設定はVoltage 2.5kV、Resistor 200Ω、Capasitor 25μFで行った。その後、50μg/mlのアンピシリンを含むLBアガープレートで一晩培養することで、pTrp1659が導入された形質転換株を得た。このクローンをLB培地にて37℃で一晩培養した後に、新しい培地に再度植菌し直し、さらに5時間培養した。600nmの吸光度が2～3であることを確認し、3β-INDOLEACRYLIC ACID(Sigma社)を終濃度100μg/mlの濃度で添加し、37℃で4時間培養を行い、sCD14(1-285)を誘導発現させた。次に、大腸菌を回収し、BugBuster Protein Extraction Reagent(Novagen社)を用いてInclusion bodyを調製した。その後、SDS-PAGE用バッファーにて溶解し、SDS-PAGEを行い、抗CD14抗体によるWestern blottingでsCD14(1-285)の発現を確認した。

#### 【0070】

免疫原用sCD14(1-285)は同様にJE7924形質転換株を1lのLB培地で培養し調製した。まず培養液を遠心分離し、大腸菌を集菌後、菌体をD-PBSで洗浄し、集めた菌体に50mlのBugBuster Protein Extraction Reagent(Novagen、以下BugBusterと記載)を加えて懸濁し、室温で30分間放置した。菌体溶解後、10分間ソニケーション(US-3、井内盛栄堂)処理し、10000×g、4℃にて20分間遠心分離し、上清を除去した。再度同様にソニケーション処理し、得られた沈殿を50mlのBugBusterに懸濁した。懸濁液に1mlの10mg/mlのリゾチーム(生化学工業)を加えて緩やかに攪拌後、室温で10分間放置し、続けて200mlの10分の1量の高濃度BugBusterを加えて攪拌後、同様に遠心分離し、上清を除去した。得られた沈殿に、200ml

1の1/10濃度のBug Busterを加えて懸濁し、同様に遠心分離し、この操作を数回繰り返した。最終的に得られた沈殿に100mlのD-PBSを加え、Inclusion Bodyを得た。

#### 【0071】

sCD14 (1-285) の調製は、まずInclusion Bodyを1%のTriton X100を含むTE緩衝液 (pH 8.0、ニッポンジーン) に溶解し、凍結融解を3回行い、遠心し沈殿を回収した。再度1%のTriton X100を含むTE緩衝液 (pH 8.0、ニッポンジーン) に溶解し、氷冷後250μAで10秒間隔で12分間超音波処理を行い、遠心後沈殿を回収した。沈殿を1%のTriton X100、0.2M NaOHを含むTE緩衝液 (pH 8.0、ニッポンジーン) に溶解し、37℃で10分間処理、遠心、再溶解を3回行った後、沈殿を回収した。得られた沈殿を6Mのグアニジン塩酸を含む水溶液に溶解し、精製sCD14 (1-285) を調製した。濃度はBSAを標準品としてブレッドフォードのタンパクアッセイ法により算出した。

#### 【0072】

##### 3-(2) 抗CD14モノクローナル抗体の作製

###### 【1】 F1106-13-3抗体の作製

上記に記載の大腸菌由来sCD14 (1-285) を投与抗原として、モノクローナル抗体を作製した。まず、ddyマウス6週齢メスの腹腔に精製sCD14 (1-285) 20μgをフロイント完全アジュバント (DIFCO) と等量混合して200μL投与した。2週間後、精製sCD14 (1-285) 20μgをフロイント不完全アジュバント (DIFCO) と等量混合し、腹腔内に200μL投与した。細胞融合3日前にマウスの腹腔に抗原50μgを投与した。3日後、無菌的に脾臓を摘出し、脾臓よりリンパ球を分離し、安東民衛・千葉丈/著「単クローナル抗体実験操作入門」83ページ、1991年(講談社)にしたがってミエローマ細胞 (P3×63-Ag. 8. U·1) と10:1で混合し、ポリエチレンギリコールを用いて細胞融合を行った。HAT培地によりハイブリドーマを選別後、sCD14 (1-285) と結合する抗体を産生しているハイブリドーマのスクリーニングをELISA法で行った。

#### 【0073】

まず、sCD14 (1-285) をPBS (pH 6.4) で0.4μg/mLに希釈し、イムノプレート (Maxisorb、NUNC) の各ウエルに50μL添加した。4℃で一晩反応後、イオン交換水で5回洗浄し、0.5%BSAを含むPBS (pH 6.4) を各ウエルに100μL添加し、プロッキングを行った。サンプリングした培養上清を各ウエルに添加し37℃で1時間反応させた後、0.05%Tween 20を含む生理食塩水で3回洗浄した。次にペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体 (DAKO) を10%ウサギ血清を含むPBSで1000倍に希釈した溶液を各ウエルに50μL添加した。37℃で1時間反応後、同様に5回洗浄しテトラメチルベンジジン溶液 (TMB·BioFx) を各ウエルに添加した。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止した。450nmの吸光度をプレート分光光度計 (NJ-2100、日本インターメッド) で測定し、sCD14 (1-285) と結合する抗体を産生するハイブリドーマを含むウエルを選択した。次に選択したウエルより安東民衛・千葉丈/著「単クローナル抗体実験操作入門」83ページ、1991年(講談社)にしたがって限界希釈法によりクローニングした。10日後、同様にsCD14 (1-285) に対する反応性を指標としてスクリーニングを行い、ハイブリドーマを選択したところ12種類の抗sCD14 (1-285) モノクローナル抗体産生ハイブリドーマが得られた。

#### 【0074】

選択したハイブリドーマを10%FCS/RPMI-1640培地 (Sigma) で培養後、Hybridoma-SFM培地 (Invitrogen) で培養し抗体を産生させ、プロテインA (Prosep-A、ミリポア) を用いて抗体を精製した。特に反応性の高い抗体であるF1106-13-3抗体のサブタイプをIsoStrip Mouse Monoclonal antibody Isotyping Kit (Roch

e) を用いて決定したところサブタイプは IgG2b·κ であった。

次に樹立した F1106-13-3 抗体の結合領域（エピトープ）を明らかにするため、CD14 のアミノ酸配列を N 末端側から 10 アミノ酸ずつ合成したペプチドライブラリーメンブレン（Custom SPOTS、Sigma Genosys）を用いて解析した。すなわち、メンブレンをマニュアルに従ってブロッキングした後、F1106-13-3 抗体を反応させ、洗浄後、β ガラクトシダーゼ結合抗マウス抗体を反応させた。メンブレンを洗浄後、X-gal を用いて抗体が結合するペプチド配列を検出した。なお、ペプチドライブラリーメンブレンのペプチドの配列は、1 番目から 154 番目までのアミノ酸配列を C 末端の 2 アミノ酸を重ねる形で 10 アミノ酸ずつ合成した 19 ペプチドを解析に使用した。ペプチドは実施例 1- (1) と同様に調製した。

その結果、F1106-13-3 抗体は CD14 の N 末端より 17 ~ 26 番のアミノ酸配列（CNFSEPPQPDW）と結合することが明らかになった。

#### 【0075】

##### 【2】 F1031-8-3 抗体の作製

F1031-8-3 抗体は WO01/22085 号公報の実施例 7 に記載の方法を用いて作製した。簡単に記載すれば、本抗体はヒト血中の CD14 蛋白質をマウスに免疫して作製した抗体であり、IsoStrip Mouse Monoclonal antibody Isotyping Kit (Roche) を用いて決定したサブタイプは IgG2b·κ であった。

F1031-8-3 抗体の特異性を確認するため、実施例 3- (1) 記載の大腸菌由来 sCD14 (1-285) 及び WO01/72993 号公報の実施例 8 及び実施例 9 に記載の方法を用いて COS 細胞により調製した sCD14 (1-356)、sCD14 (1-307) S286C を用いて結合活性を測定した。まず、Hybond-C extra (アマシャム バイオサイエンス) に sCD14 (1-356)、sCD14 (1-307) S286C、sCD14 (1-285) または BSA を各 250 ng/スポットでメンブレン上に固定化し、乾燥後 0.05 g/ml のスキムミルク (明治乳業) を含む 0.05% Tween 20、PBS (pH 6.4) でブロッキングした。室温で 1 時間静置後、0.05% BSA を含む 0.05% Tween 20、PBS (pH 6.4) で 3 μg/ml に希釈した F1031-8-3 抗体を加え、室温で 1 時間反応後、0.05% Tween 20、PBS (pH 6.4) で洗浄した。

#### 【0076】

次に 10% ウサギ血清を含む 0.05% Tween 20、PBS (pH 6.4) で 50 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体 (DAKO) を添加し、37℃ で 30 分間反応した後、同様に洗浄し ECL キット (アマシャム バイオサイエンス) で結合活性を確認した。その結果、表 1 に示すように F1031-8-3 抗体は大腸菌由来 sCD14 (1-285)、sCD14 (1-307) S286C、sCD14 (1-356) に結合したが、BSA とは結合せず、全てのタイプの CD14 蛋白質を特異的に認識していることが明らかになった。結果を表 1 に示した。表 1 の + は ECL によりフィルム上にスポットが検出された場合を示し、- はスポットが検出されない場合を示す。

#### 【0077】

【表1】

	s CD14 (1 -356)	s CD14 (1 -307) S2 86C	s CD14 (1 -285)	BSA
結合活性	+	+	+	-

## 【0078】

## 3-(3) ヒト低分子量CD14の測定系の検討

ヒト低分子量CD14を特異的に検出可能な系を作製するため、実施例1、2、3-(2)に記載の抗体を用いてサンドイッチEIA系を作製した。

## [1] ペルオキシダーゼ標識抗体の調製

ペルオキシダーゼ標識抗体は中根らの方法 (J. Histochim. Cytochem., 22巻、p. 1084、1974年) に従い4mgのペルオキシダーゼ(東洋紡)を蒸留水に溶解し、100mMの過ヨウ素酸を添加し25℃で20分間反応した。反応終了後、1.5%エチレン glycol を添加し25℃で10分間反応させ1mM酢酸緩衝液(pH 4.4)に対して透析した。精製したF1031-8-3抗体及びF1106-13-3抗体それぞれを10mM炭酸緩衝液(pH 9.5)で透析し、4mgに対して0.2M炭酸緩衝液(pH 9.5)を70μl添加して活性化した4mgのペルオキシダーゼを抗体と等量に混合し25℃で2時間反応した。次に4mg/mLの水素化ホウ素ナトリウムを添加し、さらに2時間4℃で反応した。反応液をPBSに透析し、ペルオキシダーゼ標識F1031-8-3抗体(以下、F1031-8-3-HRPと記載する場合がある)及びペルオキシダーゼ標識F1106-13-3抗体(以下、F1106-13-3-HRPと記載する場合がある)を得た。液量を測定し使用した抗体量より抗体濃度を算出した。

## 【0079】

## [2] サンドイッチEIA系の作製 &lt;1&gt;

固相抗体として実施例1で作製したS68抗体を使用し、標識抗体として実施例3-(2) [1] 及び [2] で作製した抗体を使用する2ステップサンドイッチEIA系を作製した。すなわちS68抗体をD-PBS(pH 7.4)で10μg/mLに希釈し、イムノプレート(Maxisorb、NUNC)の各ウエルに50μL添加した。4℃で一晩反応後、イオン交換水で5回洗浄し、0.1%StabilGuard(SurModics, Inc)と0.1%Tween20を含むD-PBSを各ウエルに100μL添加しブロッキングした。次に1%の健常ヒト血清(3C10を用いて可溶型CD14を除去した血清、以下、CD14吸収血清と記載)、0.1%BSAを含むPBS(pH 7.4)を希釈液として、ヒト正常人血清及びヒト敗血症患者血清を20倍に希釈した希釈検体を調製した。希釈検体をウエル当たり50μL添加し、37℃で2時間反応させた。反応終了後、0.05%Tween20を含む生理食塩水で3回洗浄し、5%ラット血清、1%マウス血清、0.1%Tween20を含む76mM PBS(pH 8.0)で0.6μg/mLに希釈したF1031-8-3-HRPまたはF1106-13-3-HRPを各ウエルに50μL添加した。37℃で2時間反応後、同様に5回洗浄し、テトラメチルベンジジン溶液(TMB、BioFix)を各ウエルに添加した。室温で20分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止し、プレート分光光度計(NJ-2100、日本インターメッド)で450nmの吸光度を測定した。その結果、表2に示すようにS68ペプチド由来抗体を組み合わせた系では正常人では上昇せず、敗血症患者特異的に上昇する、血中可溶型蛋白質、すなわち本発明で定義している低分子量s-CD14が測定できた。

## 【0080】

## [3] サンドイッチEIA系の作製 &lt;2&gt;

固相抗体として実施例2で作製したF1146-17-2抗体を使用し、標識抗体として実施例3-(2) [2] で作製した抗体を使用する2ステップサンドイッチEIA系を作製した。F1146-17-2抗体をPBS (pH 6.4) で120  $\mu$ g/mLに希釈し、イムノプレート (Maxisorb, NUNC) の各ウエルに50  $\mu$ L添加した。56°Cで30分反応後、イオン交換水で5回洗浄し、0.1% Stabil Guard (SurModics, Inc) と0.1% Tween 20 (和光純薬) を含むPBSを各ウエルに100  $\mu$ L添加しブロッキングした。次に1% BSAを含むPBS (pH 6.4) を希釈液としてヒト正常人血清及びヒト敗血症患者血清を10倍に希釈した希釈検体を調製した。希釈検体をウエル当たり50  $\mu$ L添加し、25°Cで2時間反応した。反応終了後、0.05% Tween 20を含む生理食塩水で3回洗浄し、5% ラット血清、1% マウス血清、0.1% Tween 20を含む7.6 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) で0.5  $\mu$ g/mLに希釈したペルオキシダーゼ標識F1031-8-3抗体を各ウエルに50  $\mu$ L添加した。25°Cで2時間反応後、同様に5回洗浄し、テトラメチルベンジジン溶液 (TMB, BioFix) を各ウエルに添加した。室温で20分間反応後、0.5 M 硫酸溶液で反応を停止し、プレート分光光度計 (NJ-2100、日本インターメッド) で450 nmの吸光度を測定した。その結果、表2に示すようにS68ペプチド特異的モノクローナル抗体はS68抗体同様、正常人血清ではほとんどなく、敗血症患者血清では高値を示す低分子量S-CD14が測定できた。すなわち、S68ペプチドと結合する抗体はポリクローナル抗体でも、モノクローナル抗体でも、サンドイッチ測定系ができるることを確認できた。結果を表2に示した。表2の++は450 nmの吸光度が希釈液単独の吸光度の4倍以上を示し、+は2倍以上、-は希釈液と同等の吸光度を示す。

## 【0081】

## 【表2】

抗体組み合わせ		測定値	
固相側	標識側	敗血症患者	正常人
S68抗体	F1031-8-3抗体	++	-
S68抗体	F1106-13-3抗体	++	-
F1146-17-2抗体	F1031-8-3抗体	+	-

## 【0082】

## [4] サンドイッチEIA系の作製&lt;3&gt;

固相抗体としてF1031-8-3抗体を使用し、標識抗体としてS68抗体を使用する3ステップサンドイッチEIA系を作製した。本EIA系は以下のようにS68抗体をビオチン化して行った。0.15 M NaClを含む0.05 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) に置換し0.93 mg/mLの濃度に調製したS68抗体0.5 mLにDMSOで溶解し300  $\mu$ g/mLに調製したD-Biotinoyl- $\epsilon$ -Aminocaproic Acid N-Hydroxysuccinimide Ester (Roche) を50  $\mu$ L添加し、室温で2時間攪拌しながら反応した。反応終了後、脱塩カラム (NAP-5、アマシャムバイオサイエンス) によりPBS (pH 7.4) に置換した。調製したビオチン化S68抗体 (Bio-S68抗体と記載する場合がある) の濃度は280 nmの吸光度より吸光係数1.4を用いて算出した。サンドイッチEIA系はイムノプレート (Nunc) にF1031-8-3抗体を固相化し、ブロッキングした。ブロッキン

グ液を廃棄し、0.1%BSA/PBSに溶解したsCD14(1-307)s286c(以下、標準品と記載することがある)500ng/mlと標準品を添加していない溶液をネガティブコントロールとして各ウエルに添加した。37℃で1時間反応後プレートを洗浄し、続けて2%ラット血清、1%マウス血清、1%ウサギ血清、0.1%Tween20を含むPBS(pH7.4)で希釈し1μg/mlに調製したビオチン化S68抗体を50μl添加し37℃で1時間反応した。反応終了後洗浄し、1万倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(SA-HRPと記載する場合がある、Invitrogen)を添加した。1時間反応後洗浄し、TMB溶液(BioFX)で発色後、停止液で反応を停止し450nmの吸光度をプレート吸光度計E-Max(モレキュラーデバイス)で測定した。表3に示すように本系においてもサンドイッチEIA系ができた。すなわち、S68ペプチドと結合する抗体を、固相抗体として用いても、遊離の抗体若しくは標識抗体として用いても、サンドイッチ測定系ができるこを確認できた。表3の++は標準品0-500ng/mlでの吸光度の差が0.5Abs以上、+は0.1以上、-は0.1未満を示している。

#### 【0083】

##### [5] サンドイッチEIA系の作製<4>

固相抗体及び標識抗体は[2]と同様な系で、検体と標識抗体を同時に添加する1ステップEIA系を作製した。すなわち、S68抗体を固相化したプレートに標準品0及び500ng/mlを25μl添加し、続けて2%ラット血清、1%マウス血清、1%ウサギ血清、0.1%Tween20を含むPBS(pH7.4)で希釈し1μg/mlに調製したF1031-8-3-HRPを25μl添加し、37℃で1時間反応した。反応終了後プレートを洗浄し、TMB溶液(BioFX)で発色後、停止液で反応を停止し450nmの吸光度をプレート吸光度計E-Max(モレキュラーデバイス)で測定した。表3に示すように本系においてもサンドイッチEIA系が作製できた。すなわち、S68ペプチドと結合する抗体を使用するサンドイッチ測定系では、反応順序に関係なく、測定できることが確認できた。

#### 【0084】

##### [6] サンドイッチEIA系の作製<5>

固相抗体及び標識抗体は[2]と同様な系で、検体と標識抗体を反応後、固相抗体と反応させる2ステップEIA系を作製した。すなわち、0及び500ng/mlの標準品25μlと2%ラット血清、1%マウス血清、1%ウサギ血清、0.1%Tween20を含むPBS(pH7.4)で2μg/mlに調製したF1031-8-3-HRP25μlを混合し、37℃で1時間反応した。反応終了後、反応液をS68抗体固相化プレートに添加し37℃で1時間反応した。プレートを洗浄後TMB溶液(BioFX)で発色し、停止液で反応を停止後450nmの吸光度をプレート吸光度計E-Max(モレキュラーデバイス)で測定した。表3に示すように本系においてもサンドイッチEIA系が作製できた。すなわち、S68ペプチドと結合する抗体を使用するサンドイッチ測定系では、反応順序に関係なく、測定できることがさらに確認できた。

#### 【0085】

##### [7] サンドイッチEIA系の作製<6>

ビオチニーストレプトアビジンの特異結合を利用したサンドイッチEIA系を作製した。

###### 1) ストレプトアビジンを固相側に使用した測定系

イムノプレート(Nunc)にPBS(pH7.4)で10μg/mlに希釈したストレプトアビジン(PIERCE)を50μl分注し4℃で一夜処理し固相化した。ブロッキング後、液を廃棄し0.1%BSA/PBSに溶解した標準品0及び500ng/mlと2%ラット血清、1%マウス血清、1%ウサギ血清、0.1%Tween20を含むPBS(pH7.4)で希釈し2μg/mlにしたビオチン化S68抗体を各々25μl添加した。37℃で1時間反応後プレートを洗浄し、続けて1μg/mlに希釈したF1031-8-3-HRPを50μl添加し37℃で1時間反応した。反応終了後洗浄し、

TMB溶液(BioFX)で発色後、停止液で反応を停止し450nmの吸光度をプレート吸光度計E-Max(モレキュラーデバイス)で測定した。本系は標準品、ビオチン化S68抗体、ペルオキシダーゼ標識F1031-8-3抗体の同時添加においても同様に試験した。表3に示すように両系ともにサンドイッチEIA系が作製できた。

2) ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを使用した測定系

本系は[4]に示す方法で作製した。さらに、S68抗体固相プレートに標準品と[4]にしたがって調製したビオチン化F1031-8-3抗体(Bio-F1031-8-3と記載する場合がある)を同時に添加後、37℃で1時間反応し、洗浄後1万倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(Invitrogen)を添加する2ステップ法も検討した。1時間反応後洗浄し、TMB溶液(BioFX)で発色させ、停止液で反応を停止し450nmの吸光度をプレート吸光度計E-Max(モレキュラーデバイス)で測定した。表3に示すように本系においてもサンドイッチEIA系が作製できた。すなわち、測定対象物、ヒト血清では低分子量CD14を、S68ペプチドと結合する抗体と低分子量CD14に結合する抗体によるサンドイッチで結合させれば、ビオチンとストレプトアビジンの結合等の第二の特異結合を利用して、固相、標識物質を作成しても測定できることが確認できた。なお、Strはストレプトアビジンを示し、Bioはビオチン化を示す。

【0086】

【表3】

実施例	プレート	ステップ			反応性
		1	2	3	
[4]	F1031-8 -3抗体	標準品	Bio-S68抗 体	SA-HRP	+
[5]	S68抗体	標準品 F1031-8-3 -HRP	-	-	++
[6]	S68抗体	標準品 F1031-8-3 -HRP	S68抗体 プレート	-	++
[7] (1)	Str	Bio-S68抗体 標準品	F1031-8- 3-HRP	-	+
[7] (1)	Str	Bio-S68抗体 標準品 F1031-8-3 -HRP	-	-	++
[7] (2)	S68抗体	標準品 Bio-F1031 -8-3	SA-HRP	-	++

## 【0087】

(実施例4) イムノクロマト測定系の作製

## 4-(1) 金コロイド標識抗体を用いたイムノクロマト法

検査室、ベッドサイドなどで簡便に使用できる測定系をイムノクロマト法により作製した。概要を図1(A)に示した。まず、金コロイド(粒子径40nm、B. B. International)1mlにF1106-13-3抗体9μgを混合し、金コロイド標識F1106-13-3抗体を調製した。次に、コンジュゲートパッドを作製した。すなわち、金コロイド標識F1106-13-3抗体を520nmの吸光度が約1.5となるようにコンジュゲート塗布bufferに希釈し、10×150nmの33-Glassストリップに1ml塗布して一夜減圧乾燥した。このとき1テスト分の試薬に含まれる、金コロイド標識F1106-13-3抗体量は約50units(1unitはOD520=1.0の、金コロイド標識F1106-13-3抗体1μl)となる。抗体固相化メンブレンは以下のように作製した。S68抗体をPBS(pH7.4)で1mg/mLに希釈し、Biidot社製インクジェット塗布機を用いて0.75μl/cmとなるようニトロセルロースメンブレン(FF85/100、Schleicher&Schuel1)にライン状に塗布した。このときコントロールライン(抗マウスポリクローナル抗体

、DAKO) も同時に塗布した。乾燥後メンブレンを、0.5%カゼインを含むブロッキング液に30分間浸漬し、余分な液を取り除いた後再度乾燥させた。次に作製した各材料を用いてイムノクロマト法試薬を組み立てた。すなわち、コンジュゲートパッド、固相化メンブレン、上部吸収パッド (#900 濾紙、Schleicher & Schuell) 、サンプル滴下パッド (33-Glass ガラスファイバーフィルター、Schleicher & Schuell) をPB020プラスチックパッキングシート (BioDot) に貼り付け、BioDot社製ストリップカッターで5mm幅にカットした。カットしたストリップはハウジングケース (ニップンテクノクラスター) に組み込んでイムノクロマト法試薬とした。

#### 【0088】

作製した試薬を用いて以下のようにアッセイを行った。標準品を1%BSA-PBSで10,000~1ng/mLの範囲で10<sup>n</sup>希釈したものをサンプルとし、サンプル10 $\mu$ Lを試薬へ滴下し、室温で20分放置後ラインの有無を判定した。判定基準は以下のとおりとした。

(++) : 濃いラインが出現し明らかに陽性と判定できるレベル

(+) : 発色は薄いもののラインとして判定できるレベル

(±) : 発色らしきものが認められるがラインとして認識し難いレベル

(-) : 発色が認められないもの

その結果、図2及び表4に示すようにサンプル10ng/mL以上の濃度において「+」以上の感度が得られ、イムノクロマト測定系により簡便に迅速に測定できることが確認された。

#### 【0089】

##### 【表4】

サンプル濃度 (ng/mL)					
10000	1000	100	10	1	0
++	++	+	+	±	-

#### 【0090】

##### 4-(2) ストレプトアビジン-ビオチン系を使用したイムノクロマト法の作製

また、ストレプトアビジン-ビオチン系を用いたイムノクロマト法を作製した。概要を図1(B)に示した。まず、実施例3-2[4]にしたがってF1031-8-3抗体をビオチン化した。次に金コロイド(粒子径40nm、B.B. International)1mLにストレプトアビジン10 $\mu$ gを混合し、金コロイド標識ストレプトアビジンを調製した。金コロイド標識ストレプトアビジンを520nmの吸光度が約1.5となるようにコンジュゲート塗布bufferに希釈し、10×150nmの33-Glassストリップに1mL塗布して一夜減圧乾燥した。このとき1テスト分の試薬に含まれる、金コロイド標識ストレプトアビジン量は約50units(1unitはOD520=1.0の、金コロイド標識ストレプトアビジン1 $\mu$ l)となる。抗体固相化メンブレンは以下のように作製した。S68抗体をPBS(pH7.4)で1mg/mLに希釈し、BioDot社製インクジェット塗布機を用いて0.75 $\mu$ l/cmとなるようニトロセルロースメンブレン (FF85/100、Schleicher & Schuell) にライン状に塗布した。このときコントロールライン(抗マウスピリクローナル抗体、DAKO)も同時に塗布した。乾燥後メンブレンを、0.5%カゼインを含むブロッキング液に30分間浸漬し、余分な液を取り除いた後再度乾燥させた。次に作製した各材料を用いてイムノクロマト法試薬を組み立てた。

## 【0091】

すなわち、コンジュゲートパッド、固相化メンブレン、上部吸収パッド（#900 濾紙、Schleicher & Schuell）、サンプル滴下パッド（33-Glass ガラスファイバーフィルター、Schleicher & Schuell）をPB020プラスチックパッキングシート（BioDot）に貼り付け、BioDot社製ストリップカッターで5mm幅にカットした。カットしたストリップはハウジングケース（ニップンテクノクラスター）に組み込んでイムノクロマト法試薬とした。作製した試薬を用いて以下のようにアッセイを行った。標準品を1%BSA-PBSで10,000~1ng/mlの範囲で10<sup>0</sup>希釈したものをサンプルとし、サンプル100μlを100μlの0.1μgのビオチン化F1031-8-3を含む試薬へ滴下し、混合後ハウジングケースのサンプル滴下パッドに100μlを滴下し、室温で20分放置後ラインの有無を判定した。その結果、本系を用いても（1）と同様に100ng/mlにおいて「+」の感度が得られた。

## 【0092】

## (実施例5) フロースルー測定系の作製

フロースルー測定系は特開平6-273419の基づき作製する。すなわち、1gの分散染料（RED VIOLET、KAYARON社）を10mlの蒸留水に懸濁し、蒸留水で洗浄後5mlの蒸留水に再懸濁する。分散染料0.2mlに生理食塩水で希釈した0.5mg/mlのF1031-8-3抗体を0.2ml添加し45℃で30分間インキュベートする。氷冷後遠心分離し、得られた沈殿に0.5%BSA、10%ラクトースを含むPBS（pH7.4）に再懸濁し分散染料標識F1031-8-3抗体を調製する。次に分散染料標識F1031-8-3抗体を直径14mmの大きさに切断したろ紙（No.63、アドバンテック東洋）に0.1mlずつ分注して含浸させ、凍結乾燥を行い、可溶性試薬を被着させた多孔体を作製する。メンブレンへの固相は以下のように行う。まず、孔径5ミクロンのニトロセルロースメンブレン（アドバンテック東洋）に生理食塩水で希釈した2mg/mlのS68抗体を塗布し、37℃で乾燥させる。次に1%BSAを含むPBS（pH7.4）でプロッキングを行い、抗体固相メンブレンを作製する。作製した材料をハウジングケースに以下の順序で組み立てる。可溶性試薬を被着させた多孔体、抗体固相メンブレン、ポリプロピレンをラミネートしたろ紙（No.28、アドバンテック東洋）、0.5mm厚のポリカーボネートの透明板を順位組み合わせて測定試薬を作製する。アッセイはサンプル0.5mlを測定試薬に添加することにより開始し、サンプルが完全に吸収されて後、裏側から肉眼で呈色を観察することにより判定を行う。

## 【0093】

## (実施例6) S68抗体の特異性

実施例1で作製したS68抗体の特異性を確認するため、実施例3-（3）と同様な測定で、ペプチドにより阻止されるか検討した。すなわち、敗血症患者血清及び正常人血清の50倍希釈溶液2.5μLにS68ペプチド（アミノ酸配列53~68番）、実施例1と同様に調製した合成ペプチド（アミノ酸配列53~58番、アミノ酸配列57~62番、アミノ酸配列59~64番）またはネガティブコントロール用ペプチド（CEGNGNNFESREAC）を0、0.1、1、10μg/mlに希釈したもの2.5μLをそれぞれ添加、S68抗体と混合し競合反応させた後、S68抗体に阻止されずに結合した敗血症患者血清及び正常人血清中の低分子量CD14量を測定した。その結果、図3に示すように、低値を示した正常人血清、高値を示した敗血症患者血清とともにS68ペプチドではS68抗体と血中低分子量蛋白質の結合は阻止されたが、他の部分ペプチド（各々6アミノ酸）及びネガティブコントロール用ペプチドでは阻止されなかった。以上の結果より、S68抗体により血清中に検出されている蛋白質はS68抗体が特異的に認識しているものであることが確認された。また、S68ペプチドの部分ペプチドである3種類の合成ペプチド（アミノ酸数6個）では阻止されないことより、抗体の認識する配列は最低でも7アミノ酸以上の長さを必要とすることが確認された。

## 【0094】

## (実施例7) 作製した抗体の反応速度定数

実施例1で作製したS68抗体と実施例2で作製したF1146-17-2抗体の特異性と反応速度定数をBiacore3000(ビアコア)を用いて解析した。まず、固定化するS68ペプチド-BSAを実施例1記載の方法と同様にマレイミド化BSA(Imject Maleimed Activated BSA, PIERCE)を用いて調製した。次に、S68ペプチド-BSAをアミンカップリングキット(ビアコア)を用いてセンサーチップCM5(ビアコア)に固定化した。測定はランニング緩衝液としてHB-S-EP(ビアコア)を使用し、F1146-17-2抗体の希釈列(50、100、150、200、300nM)をフローセルにインジェクトすることで行った。データ解析はS68ペプチド-BSAのフローセル測定データからリファレンスセルデータを差し引き、Biaevaluation soft wear version 3.0(ビアコア)を用いて実施した。解離定数(KD)を算出した結果、F1146-17-2抗体は $4.8 \times 10^{-9} M$ と高い親和性を示した。なお、同様に測定した特異精製ウサギS68ペプチドポリクローナル抗体のKDは $2.2 \times 10^{-10} M$ であった。

## 【0095】

## (実施例8) ヒト低分子量CD14測定キット

## 8-(1) サンドイッチEIA系の測定キット構成例

実施例3-(3)で敗血症患者の測定では高値を示し、正常人の測定で低値を示した固相抗体、標識抗体の組み合わせを用いた可溶型蛋白質キットの構成例を示す。

<1>固相抗体：S68抗体を固相化したプレート

<2>標識抗体：ペルオキシダーゼ標識F1031-8-3抗体

<3>基質溶液(テトラメチルベンジン溶液)

その他の付属品

プレート系構成例

<4>プレート洗浄液(0.9%NaCl、0.05%Tween20溶液)

<5>試料希釈液(0.1%BSAを含むPBS溶液)

<6>反応停止液(0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液)

<7>標準品(CD14(1-307)S286C)

上記の測定キットを用いて測定する場合の測定機器<参考例>

<8>プレート分光光度計(例えばE-Max(モレキュラーデバイス社))

## 【0096】

## 8-(2)～(11) サンドイッチEIA系の測定キット構成例

8-(1)に加えて、さらにサンドイッチEIA系の測定キット構成例を表5に示す。

<1>はプレートに固相する結合物質を示す。<2>は標識した結合物質を示す。構成要素の<3>～<7>、及び参考例の測定機器<8>は8-(1)と同じ。<9>は第二の特異結合物質が結合した抗体を示す。

## 【0097】

【表5】

	〈1〉	〈2〉	〈9〉
(2)	F1146-17-2 抗体	F1031-8-3-HR P	
(3)	S68抗体	F1106-13-3-H RP	
(4)	F1146-17-2 抗体	F1106-13-3-H RP	
(5)	F1031-8-3 抗体	S68抗体-HRP	
(6)	F1031-8-3 抗体	F1146-17-2-H RP	
(7)	F1106-13-3 抗体	S68抗体-HRP	
(8)	F1106-13-3 抗体	F1146-17-2-H RP	
(9)	F1031-8-3 抗体	SA-HRP	Bio-S68抗体
(10)	Str	F1031-8-3-HR P	Bio-S68抗体
(11)	S68抗体	SA-HRP	Bio-F1031-8 -3

## 【0098】

8-(12) サンドイッチEIA系の測定キットの標準曲線

(1) の測定キットにより、実施例3-(3) [2] と同様な方法で測定した。すなわち、S68抗体をD-PBS (pH 7.4) で  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈し、イムノプレート (Maxisorb、NUNC) の各ウエルに  $50 \mu\text{L}$  添加した。4℃で一晩反応後、イオン交換水で5回洗浄し、0.1% Stabil Guard (SurModics, Inc) と0.1% Tween 20を含むD-PBSを各ウエルに  $100 \mu\text{L}$  添加しブロッキングした。次に1% CD14吸収血清、0.1% BSAを含む76 mM PBS (pH 7.4) を希釈液として0、3、25、60、100、150 ng/mLのCD14 (1-307) S286C蛋白質標準品希釈系列を調製した。標準品希釈系列をウエル当たり  $5 \mu\text{L}$  添加し、37℃で2時間反応させた。反応終了後、0.05% Tween 20を含む生理食塩水で3回洗浄し、5% ラット血清、1% マウス血清、ペルオキシダーゼ標識F

1031-8-3抗体を0.1%Tween20を含む76mM PBS(pH8.0)で0.6μg/mLに希釈した希釈標識抗体を各ウエルに50μL添加した。37℃で2時間反応後、同様に5回洗浄し、テトラメチルベンジジン溶液(TMB、BioFix)を各ウエルに添加した。室温で20分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止し、プレート分光光度計(NJ-2100、日本インターメッド)で450nmの吸光度を測定した。図4に作成した標準曲線を示した。測定感度0.6ng/mL(プランク+3SD)の高感度で簡便な測定系が実現された。

#### 【0099】

##### 8-(13) サンドイッチEIA系の特異性

ヒト血清中に存在する高分子量CD14が、作製した測定系に及ぼす影響を検討するため、0~4μg/mLの濃度の正常人血清由来可溶型CD14をCD14(1-307)S286C標準品に添加して、(12)と同様に測定を行った。その結果、図5に示すように正常人血清由来可溶型CD14は4μg/mLでも測定値に影響を及ぼさなかった。この結果より、本サンドイッチEIA系において高分子量CD14との交差反応性は0.3%以下であることがわかった。すなわち、本系はヒト血清高分子量CD14を検出せず、敗血症患者の血清で高値を示す可溶型蛋白質特異的であることが確認された。

#### 【0100】

##### 8-(14) サンドイッチEIA系の測定キットの評価

(1)のキットによる測定結果の再現性を評価した。(12)と同様に3種類の検体を用いた同時再現性の変動係数(CV)は5.8、3.6、3.5%、測定間再現性は6.2、5.2、5.1%と良好な結果であった。また、添加回収試験の回収率は88~109%と良好であり、抗凝固剤(ヘパリン、クエン酸、EDTA)の影響も認められなかつた。以上の結果より、本キットはヒト低分子量CD14を測定するのに十分な性能を有していることが示された。

#### 【0101】

##### 8-(15) イムノクロマト系の測定キット構成例

- <1> 標識抗体：金コロイドを標識したF1031-8-3抗体
- <2> コンジュゲートパッド：<1>を塗布したグラスファイバーフィルター(33-Glass Strip、Schleicher&Schuell製)
- <3> 抗体固相メンブレン：S68抗体の固相化ライン及びその下流にコントロールライン(抗マウスピリクローナル抗体の固相化ライン)を有し、0.5%カゼインでプロッキングしたニトロセルロースメンブレン(FF85/100、Schleicher&Schuell製)
- <4> サンプル滴下パッド：33-Glassグラスファイバーフィルター、Schleicher&Schuell製)
- <5> 吸収パッド(#900滤紙、Schleicher&Schuell製)
- <6> シート：PB020プラスチックパッキングシート(BioDot製)；<4>に滴下した液体が<2>、<3>、<5>の順に流れるように<2>~<5>を、<6>の上に組み立ててある
- <7> ハウジングケース(ニップンテクノクラスタ社のOEM用のケース)

なお、<1>~<5>の概要は図1(A)に示される。

#### 【0102】

##### 8-(16)~(19) イムノクロマト系の測定キット構成例

8-(15)に加えて、さらに、ビオチンとストレプトアビシンの結合の第二の特異結合を利用したサンドイッチEIA系の測定キット構成例、及び配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体の断片を利用したサンドイッチEIA系の測定キット構成例を表6に示す。<1>は標識した結合物質を示す。構成要素の<2>~<7>は同じであるが、<3>に塗布する物質として、<3>-(i)は固相化メンブレンに固相する結合物質を示し、<3>-(ii)はコントロールラインに固相する結合物質を示す。<8>は、<1>と同様に<2>に塗布若しくは<4>に塗布する、または検体に添加若しくは検体と

同時に添加する試薬である第二の特異結合物質が結合した抗体を示す。

なお、(16) <1>～<5>の概要は図1 (B) に示され、(17)～(20)も同様に理解される。

【0103】

【表6】

	<1>	<3>-(i)	<3>-(ii)	<8>
(16)	金コロイド標識S tr	S 68抗体	抗マウスピリ クローナル抗 体	B i o - F 1 0 3 1 - 8 - 3 抗体
(17)	金コロイド標識B i o	S 68抗体	S tr	S tr - F 1 0 3 1 - 8 - 3 抗体
(18)	金コロイド標識F 1 0 3 1 - 8 - 3抗体	S tr	抗マウスピリ クローナル抗 体	B i o - S 6 8 抗体
(19)	金コロイド標識S 6 8抗体	S tr	抗ウサギポリ クローナル抗 体	B i o - F 1 0 3 1 - 8 - 3 抗体
(20)	金コロイド標識した S 6 8抗体のF (a b') <sub>2</sub>	F 1 1 0 6 - 1 3 - 3抗体	抗ウサギポリ クローナル抗 体	

【0104】

なお、(20) <1>の金コロイド標識したS 6 8抗体のF (ab')<sub>2</sub>の調製は、以下のようにして行う。S 6 8抗体からのF (ab')<sub>2</sub>の調製はImmobilized Pepsin (PIERC E) を使用して以下のように行う。すなわち、S 6 8抗体を20mM酢酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解し、5mg/mlに調製する。PIERC Eのプロトコールにしたがって懸濁した0.25mlのImmobilized Pepsinを調製し、上記抗体1mlと混合する。次に37℃の恒温槽で4時間攪拌し、1.5mlの10mM Tris-HCl (pH 7.5) を添加し反応を停止する。反応液を遠心分離 (1000×g) し、ゲルと上清を分離する。次に分離した上清を1mlのprosepa (Millipore) に添加し、切断されたFc及び未切断のIgGを結合させる。同様に遠心分離し上清を回収し、PBS (pH 6.4) に対して透析する。F (ab')<sub>2</sub>の280nmの吸光度を測定し、吸光係数 (0.533mg/ml/cm<sup>-1</sup>) より濃度を算出する。得られたF (ab')<sub>2</sub>を実施例4と同様に金コロイドで標識し、金コロイド標識したS 6 8抗体のF (ab')<sub>2</sub>を得る。

## 【0105】

## 8-(21) フロースルー系構成例

- <1>染料標識抗体：RED VIOLET 染料標識S68抗体
- <2>コンジュゲートパッド：上記<1>を含浸させた滤紙（No. 63、アドバンテック東洋製）
- <3>抗体固相メンブレン：S68抗体固相化したニトロセルロースメンブレン（アドバンテック東洋製）
- <4> 吸収パッド：ポリプロピレンをラミネートしたろ紙（No. 28、アドバテック東洋）
- <5>ハウジングケース：特開平6-273419に記載のケース（持田製薬製）；<2>に滴下した液体が<2>、<3>、<4>の順に流れるように<2>～<4>を、<5>の中に組み立ててある

## 【0106】

## (実施例9) ヒト低分子量CD14の検出

実施例8-(1)に記載の測定キットが検出する敗血症患者血清中の物質を解析するため、敗血症患者血清をゲル濾過クロマトグラフィーカラム Superdex 200P C3. 2/30（アマシャムバイオサイエンス）で分画し、各分画を実施例9-(1)に記載の測定キット及び市販CD14-EIAキット（IBL-Hamburg）を用いて測定した。分子量の算出はLMWキャリブレーションキットおよびHMWキャリブレーションキット（アマシャムバイオサイエンス）のうちアルドラーゼ（158kDa）、BSA（67kDa）、オボアルブミン（43kDa）、キモトリプシン（25kDa）を用いてカラムをキャリブレートして行った。

## 【0107】

その結果、図6に示すように市販CD14-EIAキットでは分子量約57kDaの可溶型CD14が検出され、従来より報告のある49～55kDaの高分子量可溶型CD14蛋白質であると判断された。一方、実施例8-(1)に記載のキットでは分子量35～45kDa付近に敗血症患者で検出されたヒト低分子量CD14に由来するピークが検出され、また57kDa付近にはピークが検出されなかったことから、実施例8-(1)に記載のキットは血中に存在する可溶型蛋白質のみを特異的に検出していることが確認された。

ヒト低分子量CD14は、ヒトCD14のみに検出される配列を有するペプチドに特異的な抗体に結合し、またヒトCD14のN末端より17～26番のアミノ酸配列を認識する抗CD14抗体に結合する。また、ゲル濾過で分子量は35～45kDaであり、正常人の血中に存在する高分子量CD14（従来のnative CD14）よりも低分子量である。

## 【0108】

## (実施例10) 各種疾患患者血中低分子量CD14の測定

敗血症患者血清は分離菌が同定された10例を使用した（表7）。また、正常人52例（男性31例、女性21例）、及び各種疾患患者（20疾患、60例）を実施例8-(1)に記載の測定キットを用いて測定した。

## 【0109】

【表7】

番号	性別	年齢	菌
1	男	41	コアクラーゼ陰性菌
2	女	44	コアクラーゼ陰性菌
3	女	61	ヘシュウム菌
4	男	52	セラチア菌
5	男	37	大腸菌
6	女	67	大腸菌
7	男	70	黄色ブドウ球菌
8	男	51	Pantoea agglomerans
9	女	81	大腸菌
10	男	77	大腸菌

## 【0110】

血清中の低分子量CD14の濃度は正常人で0.008~0.100μg/mLに分布し、平均値は0.04μg/mLであった。敗血症患者では0.190~7.260μg/mLに分布し、平均値は2.0μg/mLであった。低分子量CD14濃度は敗血症患者では正常人及び各種疾患患者に比べ高値であり、各種疾患患者中には正常人と比較して高値を示す疾患は見出せなかった。

## 【0111】

(実施例11) 市販の血中可溶型CD14ELISAキットとの比較

## 11-(1) 各種疾患患者血中可溶型CD14の測定

実施例10の検体を市販CD14-EIAキット(IBM-Hamburg)を用いて測定した。血清中の可溶型CD14(低分子量CD14と高分子量CD14の合計と推定)の濃度は正常人で5.6~11.2μg/mLに分布し、敗血症患者では高値例が認められた。しかしながら、各種疾患患者血清中においても可溶型CD14が高値を示す例が多数認められ、敗血症患者との間に差は認められなかった。

## 【0112】

## 11-(2) S68抗体を用いたキットとの比較

実施例11で測定した低分子量CD14の測定値と比較検討を行った。表8に示すように市販CD14-EIAキットでは正常、各種疾患、敗血症間に最大1.7倍程度の差し

か認められないのに対して実施例9-(1)の測定キットでは正常人と各種疾患の間に差は認められないが、正常人と敗血症の間には50倍の差が認められ、実施例9-(1)の測定キットの測定値が敗血症で特異的に上昇することが明らかになった。

【0113】

【表8】

	血中CD14濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )			比 敗血症/正常
	正常	各種疾患	敗血症	
実施例9-(1)の測定 キット	0.04	0.06	2.0	50.0
市販CD14-EIA	7.6	9.0	13.2	1.7

【0114】

測定した正常人の平均値+3S.D.をカットオフ値（低分子量CD14-EIA:0.134  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、市販CD14-EIA:11.14  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）として陽性例（敗血症）と陰性例（正常+各種疾患）に分けて解析した結果を表9に示した。その結果に基づき、両キットの一一致率（（EIA陽性一致数+EIA陰性一致数）/総数×100）、感度（EIA陽性一致数/陽性例×100）、特異度（EIA陰性一致数/陰性例×100）を算出したところ、表10に示すように、低分子量CD14-EIAでは一致率94.3%、感度100.0%、特異度93.8%とカットオフ値を設定することにより敗血症の鑑別診断に有用であることが明らかになった。一方、市販のCD14-EIAでは感度、特異度とともに敗血症を診断できるほどの特異性は認められなかった。

【0115】

【表9】

分類	陽性例	陰性例		合計
		敗血症	正常	
疾患				
実施例9-(1)の測定キット	10	51	54	115
市販CD14-EIA	6	51	45	102
合計	10	52	60	122

【0116】

【表10】

	実施例9の測定キット	市販CD14-EIA
一致率 (%)	94.3%	83.6%
感度 (%)	100.0%	60.0%
特異度 (%)	93.8%	85.7%

## 【図面の簡単な説明】

## 【0117】

【図1】S68ペプチドポリクローナル抗体を用いたイムノクロマト法キットの概要図である。(A)は、標識抗体として金コロイド標識F1031-8-3を用いたイムノクロマト法の概要図である。(B)は、第二の結合物質として、ビオチン及びストレプトアビジンを用いたイムノクロマト法キットの概要図である。

【図2】S68ペプチドポリクローナル抗体を用いたイムノクロマトキットにより、標準物質を測定した結果を示している。

【図3】S68ペプチドポリクローナル抗体と低分子量CD14蛋白質の結合をS68ペプチドのみが阻止する結果を示した図である。(A)は、正常人血清中で結合していない状態を示し、(B)は、敗血症患者血清中でのS68ペプチドの結合阻害を示している。

【図4】sCD14(1-307)S286C蛋白質を用いた本発明の低分子量CD14-EIAキットの標準曲線を示した図である。

【図5】sCD14(1-307)S286C蛋白質を用いて本発明の低分子量CD14-EIAキットの測定値に正常人血清由来可溶型CD14蛋白質が影響しないことを示した図である。

【図6】ゲル濾過クロマトグラフィーにより敗血症患者血中の低分子量CD14蛋白質及び高分子量CD14蛋白質をそれぞれ低分子量CD14-EIAキット及び市販CD14-EIAキット(ABL-Hamburg)により解析した結果を示した図である。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.  
<120> Kit for measuring a low molecular human CD14 protein  
<130> MD0677  
<150> Japan, 2002-328866  
<151> 2002.11.12  
<160> 7

<210> 1  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> human  
<400> 1  
Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala Asp Thr Val Lys

<210> 2  
<211> 356  
<212> PRT  
<213> human  
<400> 2  
Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys Val  
Cys Asn Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Trp Ser Glu Ala Phe Gln Cys  
Val Ser Ala Val Glu Val Glu Ile His Ala Gly Gly Leu Asn Leu Glu  
Pro Phe Leu Lys Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala  
Asp Thr Val Lys Ala Leu Arg Val Arg Arg Leu Thr Val Gly Ala Ala  
Gln Val Pro Ala Gln Leu Leu Val Gly Ala Leu Arg Val Leu Ala Tyr  
Ser Arg Leu Lys Glu Leu Thr Leu Glu Asp Leu Lys Ile Thr Gly Thr  
Met Pro Pro Leu Pro Leu Glu Ala Thr Gly Leu Ala Leu Ser Ser Leu  
Arg Leu Arg Asn Val Ser Trp Ala Thr Gly Arg Ser Trp Leu Ala Glu  
Leu Gln Gln Trp Leu Lys Pro Gly Leu Lys Val Leu Ser Ile Ala Gln  
Ala His Ser Pro Ala Phe Ser Cys Glu Gln Val Arg Ala Phe Pro Ala  
Leu Thr Ser Leu Asp Leu Ser Asp Asn Pro Gly Leu Gly Glu Arg Gly  
Leu Met Ala Ala Leu Cys Pro His Lys Phe Pro Ala Ile Gln Asn Leu  
Ala Leu Arg Asn Thr Gly Ile Glu Thr Pro Thr Gly Val Cys Ala Ala  
Leu Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro His Ser Leu Asp Leu Ser His Asn  
Ser Leu Arg Ala Thr Val Asn Pro Ser Ala Pro Arg Cys Met Trp Ser  
Ser Ala Leu Asn Ser Leu Asn Leu Ser Phe Ala Gly Leu Glu Gln Val  
Pro Lys Gly Leu Pro Ala Lys Leu Arg Val Leu Asp Leu Ser Cys Asn  
Arg Leu Asn Arg Ala Pro Gln Pro Asp Glu Leu Pro Glu Val Asp Asn  
Leu Thr Leu Asp Gly Asn Pro Phe Leu Val Pro Gly Thr Ala Leu Pro  
His Glu Gly Ser Met Asn Ser Gly Val Val Pro Ala Cys Ala Arg Ser  
Thr Leu Ser Val Gly Val Ser Gly Thr Leu Val Leu Gln Gly Ala  
Arg Gly Phe Ala

<210> 3  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> human

<400> 3  
Gly Leu Pro Ala Lys Leu Arg Val Leu Asp Leu

<210> 4  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> human  
<223> oligomer:8 linkS  
<400> 4  
agcttaggaa ttt

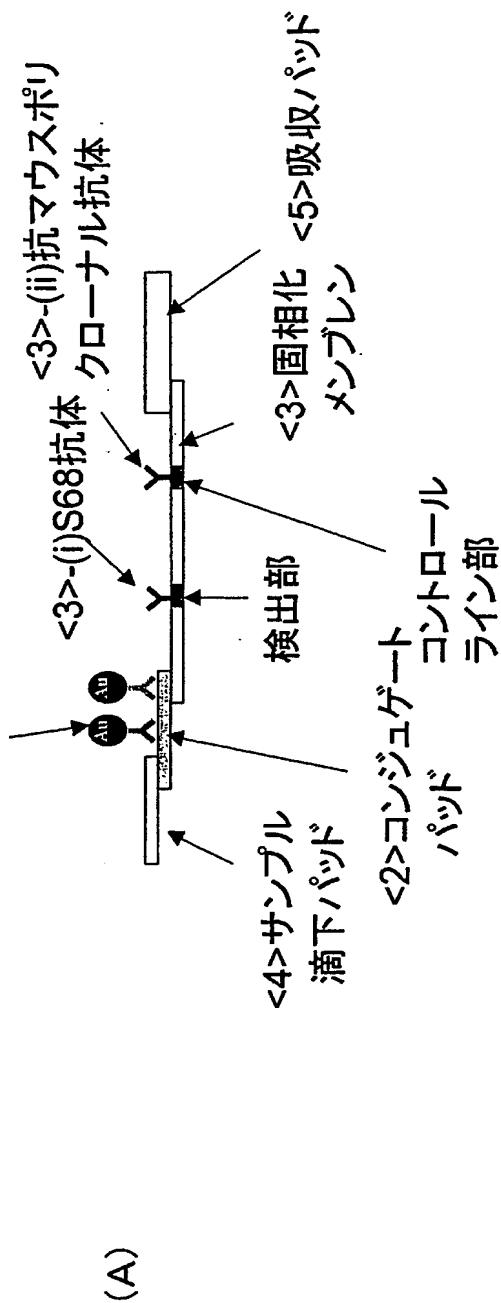
<210> 5  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> human  
<223> oligomer:8 linkA  
<400> 5  
ctagaaattc cta

<210> 6  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> human  
<223> antisense primer  
<400> 6  
acatctagat gaccacgcca gaacct

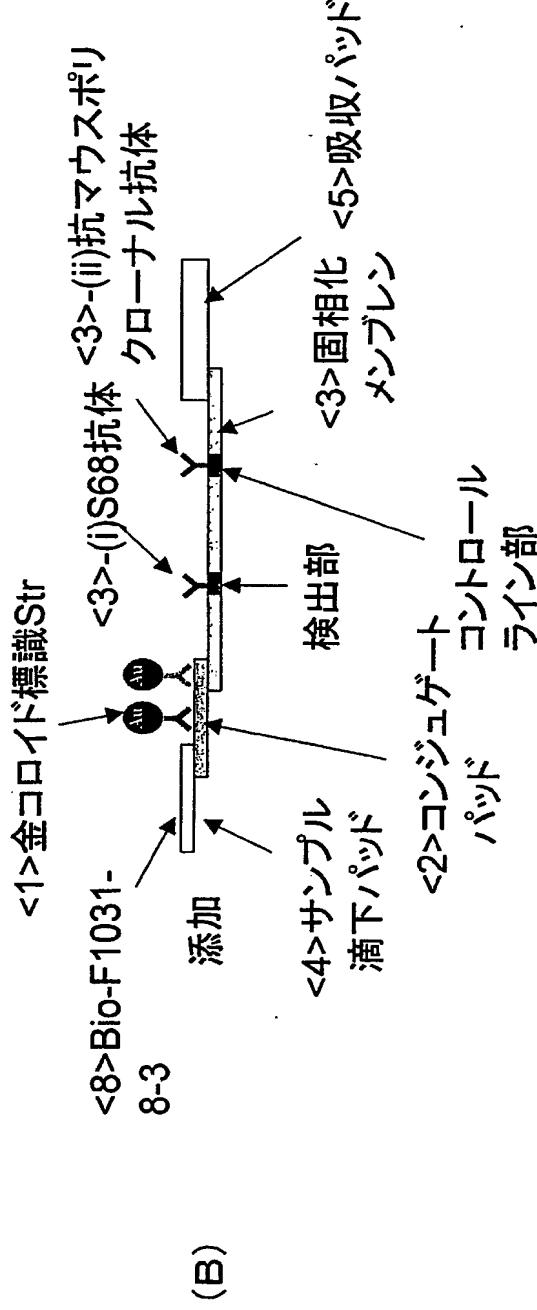
<210> 7  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> human  
<223> antisense primer  
<400> 7  
tttggatcct tactagagat cgagcaatct

【書類名】 図面  
【図 1】

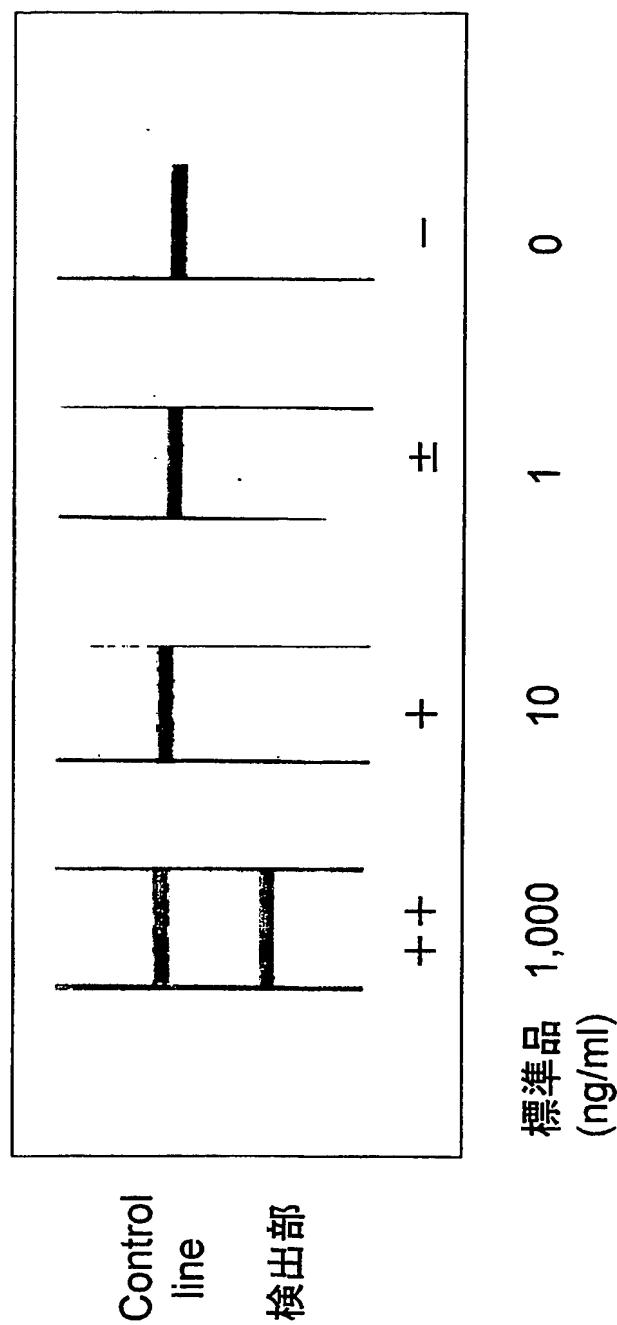
&lt;1&gt;金コロイド標識F1106-13-3



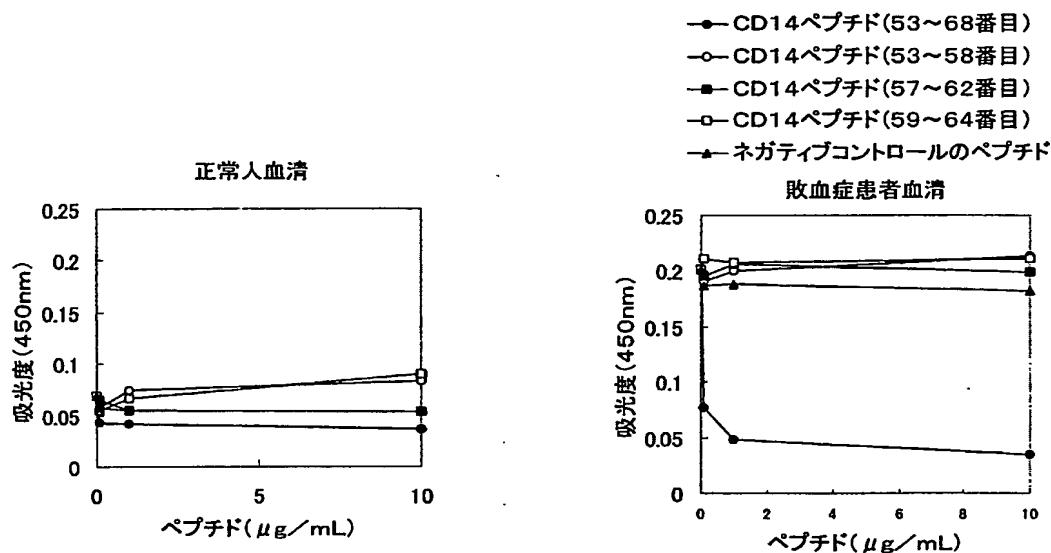
&lt;1&gt;金コロイド標識Str



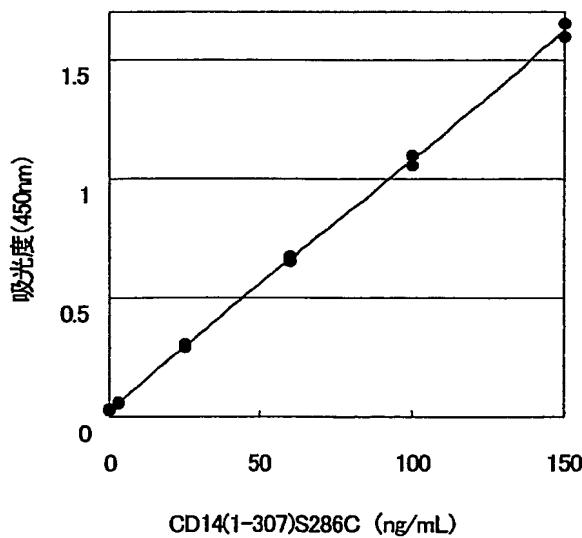
【図2】



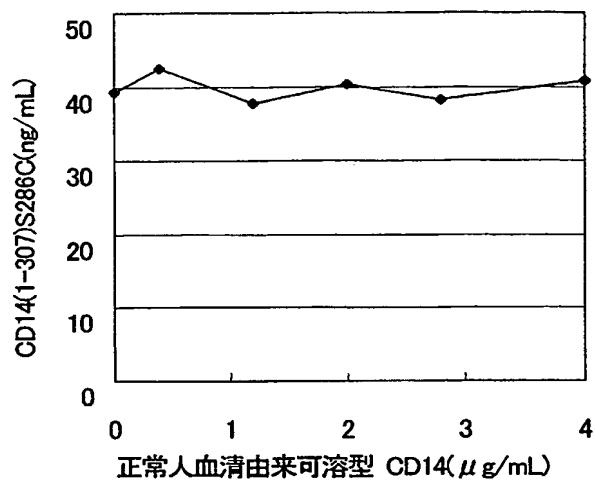
【図3】



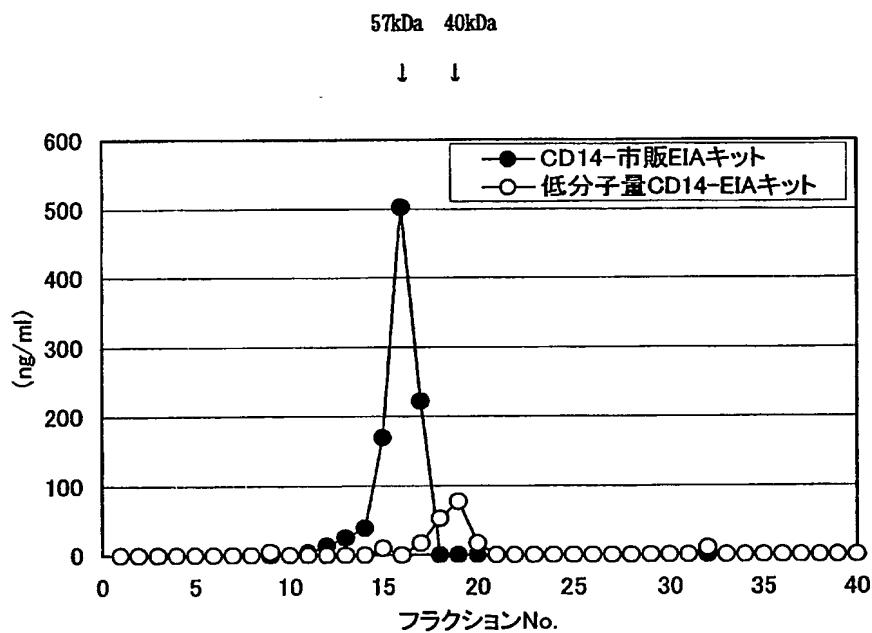
【図4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】特定のアミノ酸配列を認識する抗体、および、ヒト低分子量CD14を高感度、簡便かつ特異的に定性又は定量でき、敗血症患者の診断に有用であるキットの提供。

【解決手段】配列番号1に記載の16アミノ酸残基からなるペプチドと結合する抗体、または、該抗体または該抗体の断片を含む、サンドイッチ免疫測定法により測定するヒト低分子量CD14測定キット。

【選択図】なし

特願2003-330775

出願人履歴情報

識別番号 [000181147]

1. 変更年月日 1990年 8月29日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都新宿区四谷1丁目7番地  
氏 名 持田製薬株式会社